

**Univerzitet u Beogradu**

**HEMIJSKI FAKULTET**



**Srđan B. Miletić**

**ISPITIVANJE ZAGAĐENIH STANIŠTA KAO  
IZVORA MIKROORGANIZAMA ZA  
BIOREMEDIJACIJU**

**– Doktorska disertacija –**

**Beograd, 2013.**

Универзитет у Београду

ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ



Срђан Б. Милетић

**ИСПИТИВАЊЕ ЗАГАЂЕНИХ СТАНИШТА КАО  
ИЗВОРА МИКРООРГАНИЗАМА ЗА  
БИОРЕМЕДИЈАЦИЈУ**

– Докторска дисертација –

Београд, 2013.

**University of Belgrade**

**FACULTY OF CHEMISTRY**



**Srđan B. Miletić**

**RESEARCH OF POLLUTED HABITATS AS  
SOURCES OF MICROORGANISMS FOR  
BIOREMEDIATION**

**– Doctoral Dissertation –**

**Belgrade, 2013.**

***Mentor:***

Prof. dr Miroslav M. Vrvić, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

***Članovi komisije:***

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

Dr Vladimir P. Beškoski, docent  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

***Datum odbrane:***

***Datum promocije:***

## Ispitivanje zagađenih staništa kao izvora mikroorganizama za bioremedijaciju

### Izvod

Cilj istraživanja u okviru doktorske disertacije bio je ispitivanje zagađenih ekosistema raznorodnim polutantima (toksični metali, nafta i naftni derivati, perfluorovana jedinjenja) kao izvora mikroorganizama za bioremedijaciju. Urađena je hemijska karakterizacija kontaminiranog zemljišta južne industrijske zone Pančeva, sedimenta iz kanala otpadnih voda, zemljišta zagađenog naftom i naftnim derivatima, remedijacione halde, kao i katalizatora iz procesa desulfurizacije nafte koji predstavljaju potencijalni zagađivač životne sredine. Pored hemijske analize urađena je i FTIR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, rendgenskom spektroskopijom. Izolovani i identifikovani su aktivni konzorcijumi zimogenih mikroorganizama. Posebna pažnja je usmerena na ispitivanje uticaja huminskih kiselina kao jedne od klasa krajnjih proizvoda mikrobiološke razgradnje organskih polutanata i organske supstance supstrata na konzorcijum mikroorganizama tokom simultane bioremedijacije i humifikacije, odnosno transformacije razgrađenih organskih supstanci u »humus« kao komponentu plodnosti zemljišta.

Za praćenje promena tokom biorazgradnje, koje ukazuju na slobodnoradikalske mehanizme i njihovu moguću stimulaciju kojišćena je EPR spektroskopija. Rezultati su pokazali da ispitivane huminske kiseline direktno utiču na vezivanje hidroksil radikala vezivanjem  $\text{Fe}^{3+}$ . Zbog reaktivne prirode, gvožđe je veoma toksično za organizam ukoliko njegova unutarćelijska koncentracija nije adekvatno regulisana. Toksičnost  $\text{Fe}^{3+}$  jona je zasnovana na njegovoj mogućnosti da reaguje sa super-oksidom pri čemu se stvara  $\text{Fe}^{2+}$ .

*Ključne reči: stanište, bioremedijacija, mikroorganizmi, huminske kiseline, metali*

Naučna oblast: Biohemija

Uža naučna oblast: Mikrobiološka hemija i biotehnologija

UDK broj: 577

## Research of polluted habitats as sources of microorganisms for bioremediation

### Abstract

The objective of this doctoral dissertation was to examine the diverse ecosystems contaminated with pollutants (toxic metals, oil and oil derivatives, perfluorinated compounds) as the source of microorganisms for bioremediation. It was performed chemical characterization of contaminated soils of the southern industrial zone of Pančevo, sediments from the wastewater canal, soil contaminated by oil and oil products, bioremediation pile, as well as a catalyst for the desulfurization process of oil as a potential polluter of the environment. Beside chemical analysis it was performed FTIR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and X-ray spectroscopy. Active zymogenous consortia of microorganisms was isolated and identified. Special attention was directed to examine the effect of humic acid as one of the classes of the end products of microbial degradation of organic pollutants and organic matter substrates on microbial consortium during simultaneous bioremediation and humification or transformation of decomposed organic matter in the "humus" as a component of soil fertility.

Monitoring of changes during biodegradation that indicate the free radical mechanisms and their possible stimulation was performed by EPR spectroscopy. The results showed that the investigated humic acids directly affect the binding of hydroxyl radicals by binding of  $\text{Fe}^{3+}$ . Because of its reactive nature, iron is highly toxic to the organisms if its intracellular concentration is not adequately regulated. Toxicity of  $\text{Fe}^{3+}$  ions is based on its ability to react with a super-oxide and formation of  $\text{Fe}^{2+}$ .

*Keywords: habitat, bioremediation, microorganisms, humic acids, metals*

Science topic: Biochemistry  
Topic field: Microbial chemistry and biotechnology  
UDC number: 577

*Mojoj ćerki*

*Anji*

*Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Grupe za mikrobiološku hemiju Katedre za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Centra za hemiju i Centra za remedijaciju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju.*

*Temu za rad je predložio i radom neposredno rukovodio prof. dr Miroslav M. Vrvić, redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Njemu dugujem svoju najiskreniju zahvalnost na inspirativnim idejama, kao i hemijskom i životnom znanju i iskustvu koje mi nesebično prenosi. Hvala mu i na poverenju koje mi pruža u poslovima i na terenima gde me upoznaje sa primenom naučnih saznanja u praksi. On je učitelj od koga se može mnogo naučiti.*

*Dr Gordani Gojgić-Cvijović sam zahvalan na pažljivom čitanju i korigovanju doktorske disertacije, kao i korisnim savetima koje mi pruža u poslu.*

*Dr Vladimiru Beškoviću zahvaljujem na entuzijazmu i energiji kojima pristupa svakom poslu i koje prenosi na ostale kolege. Takođe mu zahvaljujem na korisnim savetima prilikom pisanja disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Snežani Spasić, mom velikom prijatelju, koja me je nesebično podržavala, bodrila i pomagala svih ovih godina. Njen optimizam i upornost su zadovoljujući i stimulišući na čemu joj veliko hvala.*

*Koleginicama mr Jeleni Avdalović zahvaljujem na zajedničkim eksperimentima iz oblasti bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom i otpadnim katalizatorima. Dr Mili Ilić zahvaljujem na uspešnim zajedničkim terenskim i laboratorijskim zadacima. Jovani Stefanović zahvaljujem na druženju i smehu u laboratoriji. Koleginicama dr Jeleni Milić i Nikoleti Lugonji zahvaljujem na pozitivnoj atmosferi u laboratoriji.*

*Veliku zahvalnost dugujem i Mladenu Kukiću na pozitivnoj energiji koja je bila veoma stimulativna na našim terenskim poslovima. Hvala i svim kolegama iz NRK inženjeringa i veliko hvala BREM Group u kojoj sam sticao praktična znanja iz bioremedijacije i biotehnologije.*



*Mojoj ćerki Anji i supruzi Gordani neizmerno zahvaljujem na uvekprisutnoj podršci, motivaciji i na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju koje mi neprestano pružaju. Anji se i posebno zahvaljujem na bezuslovnom poverenju i aktivnom motivisanju u izradi ove disertacije.*

*Hvala mom ocu, bratu Deanu, njegovoj supruzi Jeleni i ćerki Mariji na podršci i veri u moj rad.*

*Hvala svima koji su mi izašli u susret i pomogli delom, rečju, osmehom ili pozitivnim mislima.*

*Beograd, novembar 2013*

*Autor*

**AKRONIMI I SKRAĆENICE**

|      |  |
|------|--|
| API  | Analytical Profile Index   |
| BPK  | Biološka potrošnja kiseonika                                       |
| CFU  | Colony Forming Units   |
| Che  | Helat  |
| CID  | Charge Injector Device detektor                                    |
| DDT  | Dihlor-difenil-trihlor-etan  |
| DNK  | Dezoksi ribonukleinska kiselina                                    |
| EOMA | Elementarna organska mikroanaliza                                  |
| EPR  | Electron Spin Resonance Spectroscopy                               |
| FS   | Fentonov sistem  |
| FTIR | Fourier Transform-Infrared Spectroscopy                            |
| HA   | Ukupne aerobne i fakultativno anaerobne bakterije                  |
| HAG  | Ukupne anaerobne bakterije   |
| HES  | Supstance rastvorne u heksanu (eng. Hexane Extractable Substances) |
| HPK  | Hemijska potrošnja kiseonika                                       |
| HPLC | High-pressure liquid chromatography                                |
| HWS  | Haber Weiss system   |
| ICP  | Inductively coupled plasma   |
| KM   | Konzorcijum mikroorganizama  |
| LC   | Tečna hromatografija   |
| MS   | Masena spektrometrija  |
| NMR  | Nuklearna magnetna rezonanca                                       |
| OES  | Optical emission spectrometry                                      |
| PAH  | Policiklični aromatični ugljovodonici                              |
| PCB  | Polihlorovani bifenili   |
| PFAS | Perfluoralkilovana jedinjenja                                      |

---

|       |  |
|-------|--|
| PFCs  | Perfluorovana jedinjenja (eng. Perfluorinated Compounds) |
| PFCA  | Perfluoralkil karboksilat                                |
| PFDS  | Perfluoro dekansulfonska kiselina                        |
| PFHxA | Perfluoro heksanska kiselina                             |
| PFHxS | Perfluoro heksansulfonska kiselina                       |
| PFOA  | Perfluoro-oktanoat                                       |
| PFOS  | Perfluoro-oktan sulfonat                                 |
| PFSA  | Perfluoro sulfonske kiseline                             |
| POPs  | Persistent Organic Pollutants                            |
| PTFE  | Poli-tetra-fluor-etilen                                  |
| PVC   | Polivinil hlorid   |
| RI    | Relativna inhibicija                                     |
| RNK   | Ribonukleinska kiselina                                  |
| ROS   | Reaktivne vrste kiseonika (eng. Reactive Oxygen Species) |
| RP    | Radna podloga  |
| RVK   | Retencioni vodni kapacitet                               |
| SA    | Sulfat redukujuće bakterije                              |
| SE    | Standardna devijacija                                    |
| SL    | Ukupan broj kvasaca i spora plesni                       |
| SP    | Startna podloga  |
| SPE   | Solid Phase Extraction                                   |
| TNT   | Trinitro toluen  |
| TPH   | Total Petroleum Hydrocarbons                             |
| UV    | Ultraljubičasto  |
| VOC   | Volatile Organic Compounds                               |

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. Uvod   | 1  |
| 2. Pregled literature   | 4  |
| 2.1. Ekosistemi i staništa  | 5  |
| 2.1.1. Procesi u ekosistemima   | 6  |
| 2.1.2. Upravljanje ekosistemima   | 9  |
| 2.1.3. Tipovi ekosistema  | 10 |
| i. Kopneni ekosistemi   | 10 |
| ii. Vodeni ekosistemi   | 10 |
| 2.1.4. Strukturne i funkcionalne komponente ekosistema                                    | 11 |
| 2.2. Zemljište kao deo ekosistema   | 11 |
| 2.2.1. Sastav zemljišta   | 12 |
| 2.2.2. Organska supstanca zemljišta   | 13 |
| 2.2.3. Organizmi zemljišta  | 15 |
| 2.2.4. Neživi organski materijal  | 16 |
| 2.2.5. Huminske supstance   | 16 |
| i. Huminske kiseline  | 19 |
| ii. Fulvo kiseline  | 25 |
| iii. Odnos huminskih i fulvo kiselina   | 26 |
| iv. Humin   | 26 |
| 2.3. Izvori zagađenja zemljišta   | 27 |
| 2.3.1. Zagađenje staništa naftom, naftnim derivatima i drugim organskim zagađivačima      | 28 |
| 2.3.2. Zagađenje staništa metalima i njihovim solima                                      | 29 |
| i. Transport teških metala u zemljištu  | 32 |
| ii. Monitoring zagađenja teškim metalima  | 32 |
| 2.3.3. Zagađenje staništa perfluorovanim jedinjenjima                                     | 33 |
| 2.4. Remedijacija zagađenih staništa  | 33 |
| 2.4.1. Planiranje i realizacija remedijacije zemljišta                                    | 34 |
| 2.4.2. Tehnologije remedijacije   | 34 |
| 2.4.3. Fizičke i hemijske tehnike remediacije   | 35 |
| 2.4.4. Metode solidifikacije i stabilizacije  | 37 |
| 2.4.5. Termalni tretman   | 37 |
| 2.4.6. Bioremedijacija – biološki tretman   | 38 |
| 2.5. Uloga mikroorganizama u bioremedijaciji staništa zagađenih organskim ugljovodonicima | 39 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.6.    | Uloga mikroorganizama u bioremedijaciji staništa zagađenih metalima         | 41 |
| 2.6.1.  | Mikronutrijenti i metali u tragovima kod mikroorganizama                    | 42 |
| 2.6.2.  | Uloga gvožđa i drugih metala u metabolizmu mikroorganizama                  | 43 |
| 2.6.3.  | Mehanizmi biosorpcije metala od strane mikroorganizama                      | 45 |
| 2.6.4.  | Rezistencija mikroorganizama na toksične metale                             | 47 |
| 3.      | Materijal i metode  | 49 |
| 3.1.    | Uzorkovanje   | 50 |
| 3.1.1.  | Uzorkovanje zemljišta za određivanje teških metala                          | 50 |
| 3.1.2.  | Uzorkovanje čvrstih uzoraka   | 50 |
| 3.1.3.  | Uzorkovanje sedimenata iz kanala otpadnih voda u industrijskoj zoni Pančeva | 51 |
| 3.2.    | Analitičke metode   | 52 |
| 3.2.1.  | Temperatura   | 52 |
| 3.2.2.  | Potenciometrijsko određivanje pH vrednosti                                  | 52 |
| 3.2.3.  | Određivanje procenta higroskopne vlage                                      | 52 |
| 3.2.4.  | Nasipna masa  | 52 |
| 3.2.5.  | Određivanje sadržaja pepela   | 52 |
| 3.2.6.  | Elementarna organska mikroanaliza   | 53 |
| 3.2.7.  | Sadržaj karbonata u uzorcima zemlje   | 53 |
| 3.2.8.  | Određivanje dostupnog fosfora   | 53 |
| 3.2.9.  | Određivanje dostupnog kalijuma  | 53 |
| 3.2.10. | Retencionni vodni kapacitet   | 53 |
| 3.2.11. | Gravimetrijsko određivanje ukupnih ugljovodonika nafte (TPH)                | 53 |
| 3.2.12. | Određivanje supstanci rastvornih u heksanu                                  | 54 |
| 3.2.13. | Izolovanje i određivanje huminskih kiselina                                 | 54 |
| 3.2.14. | Određivanje optičke gustine huminskih kiselina                              | 54 |
| 3.2.15. | Priprema uzoraka za određivanje teških metala u zemljištu                   | 54 |
| 3.2.16. | Određivanje metala u vodenom ekstraktu katalizatora                         | 55 |
| 3.2.17. | Određivanje metala u katalizatoru stapanjem                                 | 55 |
| 3.2.18. | Određivanje perfluorovanih jedinjenja (PFC) u uzorcima sedimenta            | 55 |
|         | i. Standardni rastvori i reagensi   | 55 |
|         | ii. Ekstrakcija sedimenta   | 56 |
|         | iii. Instrumentalna analiza   | 56 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.3.   | Instrumentalne metode  | 56 |
| 3.3.1. | Određivanje metala metodom sa indukcijom spregnutom plazmom (ICP)  | 56 |
| 3.3.2. | Metoda rendgenske difrakcije   | 57 |
| 3.3.3. | Elektron paramagnetna spektroskopija (EPR)   | 58 |
| 3.3.4. | $^1\text{H}$ NMR spektroskopija  | 58 |
| 3.3.5. | $^{13}\text{C}$ NMR spektroskopija   | 58 |
| 3.4.   | Mikrobiološke metode   | 59 |
| 3.4.1. | Mikrobiološke podloge  | 59 |
| i.     | Podloga za određivanje broja ukupnih hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija  | 59 |
| ii.    | Podloga za određivanje broja ukupnih anaerobnih mezofilnih hemoorganoheterotrofnih bakterija               | 59 |
| iii.   | Podloga za određivanje broja kvasaca i plesni  | 60 |
| iv.    | Podloga za određivanje ukupnog broja bakterija koje razgrađuju ugljovodonike                               | 60 |
| v.     | Podloga za određivanje sulfitredukujućih klostridija   | 60 |
| vi.    | Tečna podloga za razmnožavanje i rast hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija | 61 |
| vii.   | Podloge za umnožavanje biomase konzorcijuma zimogenih mikroorganizama                                      | 61 |
| 3.4.2. | Pomoćne mikrobiološke podloge i reagensi   | 63 |
| i.     | Rastvor za pripremanje serijskih razblaženja   | 63 |
| ii.    | Ekstrakt zemlje  | 63 |
| 3.4.3. | Izolovanje i umnožavanje zimogenog konzorcijuma mikroorganizama iz zemljišta zagađenog mazutom             | 63 |
| 3.4.4. | <i>Ex-situ</i> bioremedijacija zemljišta kontaminiranog mazutom  | 64 |
| 3.4.5. | Ispitivanje inhibitornog dejstva metala na zimogeni konzorcijum mikroorganizama                            | 65 |
| 3.4.6. | Rast mikroorganizama na podlozi sa huminskim kiselinama sa i bez dodatka $\text{FeCl}_3$                   | 65 |
| 3.4.7. | Određivanje broja mikroorganizama  | 66 |
| 3.4.8. | Identifikacija mikroorganizama API testovima   | 66 |
| i.     | API 20NE   | 66 |
| ii.    | API Rapid 20E  | 66 |
| iii.   | API Coryne   | 66 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 3.5.   | Praćenje efekta huminskih kiselina na rast zimogenog konzorcijuma mikroorganizama                                     | 67  |
| 3.5.1. | Praćenje Fentonove reakcije   | 67  |
| 3.5.2. | Praćenje antioksidativnog kapaciteta huminskih kiselina   | 67  |
| 3.6.   | Statistička obrada podataka   | 67  |
| 4.     | Rezultati i diskusija   | 69  |
| 4.1.   | Hemijska i mikrobiološka karakterizacija zemljišta iz južne industrijske zone Pančeva                                 | 70  |
| 4.1.1. | Određivanje osnovnih hemijskih pokazatelja  | 71  |
| 4.1.2. | Određivanje sadržaja teških metala  | 72  |
| 4.1.3. | Mikrobiologija zemljišta  | 73  |
| 4.2.   | Hemijska i mikrobiološka karakterizacija zemljišta kontaminiranog mazutom   | 74  |
| 4.2.1. | Osnovne hemijske i mikrobiološke karakteristike sedimenata i vode   | 74  |
| 4.2.2. | Određivanje perfluorovanih jedinjenja u sedimentima kanala otpadnih voda iz južne industrijske zone Pančeva           | 77  |
| 4.3.   | Hemijska i mikrobiološka karakterizacija sedimenata i vode iz kanala otpadnih voda iz južne industrijske zone Pančeva | 78  |
| 4.3.1. | Analiza izolovanih kultura mikroorganizama API testovima  | 82  |
| 4.4.   | Osnovne karakteristike ispitivanih katalizatora   | 82  |
| 4.4.1. | Rendgenska analiza ispitivanih katalizatora   | 84  |
| 4.4.2. | Ispitivanje inhibitornog efekta molibdena i kobalta na izolovan konzorcijum mikroorganizama                           | 90  |
| 4.5.   | Karakterizacija huminskih kiselina  | 90  |
| 4.5.1. | Elementarna analiza   | 90  |
| 4.5.2. | Optička gustina   | 91  |
| 4.5.3. | FTIR spektroskopija   | 92  |
| 4.5.4. | <sup>1</sup> H NMR spektroskopija   | 93  |
| 4.5.5. | <sup>13</sup> C NMR spektroskopija  | 94  |
| 4.6.   | Efekat huminskih kiselina na rast zimogenog konzorcijuma mikroorganizama  | 95  |
| 4.6.1. | Praćenje antioksidativnog kapaciteta huminskih kiselina   | 95  |
| 4.6.2. | Praćenje efekta huminskih kiselina na rast konzorcijuma   | 97  |
| 5.     | Zaključci   | 99  |
| 6.     | Literatura  | 102 |

# **1. UVOD**



U poslednjih sto godina u životnu sredinu su izbačene ogromne količine otpadnog materijala. Do početka drugog svetskog rata ovaj otpadni materijal i njegovi negativni efekti nisu bili značajni, međutim po njegovom završetku usled neodgovornog odlaganja svih vrsta otpada počeli su da se javljaju ozbiljni problemi. U današnje vreme javnost je veoma zainteresovana za rešavanje tih problema.

Izvori otpadnog materijala mogu biti industrijskog i poljoprivrednog porekla. Na primer, energetska industrija generiše ogromne količine otpada korišćenjem uglja. U prošlosti je ovakav otpad spaljivan ili odlagan. Često su komponente tog otpada dospevale u zemljište ili podzemne vode. Ovakvi izvori zagađenja se smatraju tačkasti izvori. Sa druge strane, poljoprivredni sektor je najveći korisnik pesticida i veštačkih đubriva koji se koriste na velikim površinama (netačkasti izvor), a zagađivači se mogu naći i u površinskim i podzemnim vodama.

Kontaminacija podzemnih voda predstavlja poseban problem pošto su ove vode glavni izvor pitke vode. U nekim industrijski razvijenim zemljama oko 96% ukupne pitke vode potiče od podzemnih voda.

Količina otpada koja se danas nalazi u životnoj sredini je prevelika da bi mogla da se ukloni prirodnim putem – samoprečišćavanjem. Stoga je neophodno da se očiste zagađeni prostori i da se vrate u stanje pre zagađenja, odnosno da se izvrši remedijacija zagađenog staništa. Za najveći broj metoda koje se u svetu trenutno koriste karakteristično je da kao posledica njihove upotrebe nastaje novi otpad koji zahteva kontrolisano odlaganje.

Jedna od tehnologija koja ima sve veću primenu u svetu za remedijaciju zagađenih staništa, pre svega zemljišta, je bioremedijacija. Bioremedijacija je posebno efikasna u saniranju staništa zagađenih naftom i naftnim derivatima, ali se koristi i za tretman otpada koji još nije dospeo u životnu sredinu, a sve češće se koristi i za staništa zagađena teškim metalima. Jedna od najefikasnijih vrsta bioremedijacije je upotreba nepatogenih mikroorganizama za koje zagađujuće supstance predstavljaju izvor hranljivih supstanci. Mikroorganizmi koji su prirodno prisutni na mestu zagađenja, prevode toksične supstance u proizvode koji su netoksični za čoveka i okolinu.

Organski zagađivači mogu biti transformisani i do ugljen-dioksida i vode, a teški metali mogu biti prevedeni u svoju netoksičnu formu.

Iako se u bioremedijaciji mogu koristiti i mikroorganizmi koji su preneseni sa nekog drugog zagađenog ili čak i nezagađenog staništa, najbolji efekat pokazuju oni koji su izolovani na samom mestu zagađenja. Mnoge komponente zagađivača mogu biti razgrađene samo zajedničkim delovanjem više sojeva mikroorganizama – konzorcijumom.

Zagađenje životne sredine toksičnim metalima, kontaminantima naftnog tipa i novim klasama POPs, kao što su PFCs je uvek prisutan problem i izazov za istraživače. Stalno su aktuelni mikroorganizmi kao „biološki agensi“ u čišćenju, posebno istorijskih zagađenja, zaštiti i očuvanju životne sredine. Biohemijske putanje i mehanizmi razgradnje i inaktivacije polutanata su izazovi, kako za istraživače, tako i za one koji se bave primenom. Zbog sposobnosti da uklanjaju metabolički vodonik-peroksid posebna pažnja je usmerena na huminske supstance, važan sastojak organske supstance zemljišta. Huminske supstance vezuju metale (kao što su mangan, bakar, gvožđe, ...) koji su redoks aktivni i reaguju sa  $H_2O_2$  u Fentonovoj reakciji dajući  $\cdot OH$  koga vezuju huminske kiseline.

U ovom radu su proučavana staništa zagađena raznorodnim zagađivačima (toksični metali, nafta i naftni derivati, perfluorovana jedinjenja-PFCs) kao izvori mikroorganizama za bioremedijaciju ovih delova životne sredine, prvenstveno kao aktivnih zimogenih konzorcijuma. Osim toga, praćene su promene tokom biorazgradnje koje ukazuju na slobodnoradikalne mehanizme i njihovu moguću stimulaciju.

Iz kontaminiranih industrijskih sredina, koje su okarakterisane, pre svega u odnosu na polutante (toksični metali, nafta i naftni derivati i perfluorovana jedinjenja) su izolovani konzorcijumi zimogenih mikroorganizama, a njihova identifikacija je urađena fiziološko-biohemijskim metodama. Praćena je promena koncentracije zagađivača i huminskih kiselina i urađena je njihova osnovna karakterizacija primenom FTIR,  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR, kao i rendgenska analiza. EPR spektroskopijom su praćeni slobodnoradikalni mehanizmi.

## **2. PREGLED LITERATURE**

## 2.1. EKOSISTEMI I STANIŠTA

Ekosistem predstavlja zajednicu biotičkih i abiotičkih faktora na određenom staništu. U biotičke faktore se ubrajaju živi organizmi – biljke, životinje i mikroorganizmi, a u abiotičke sunčeva svetlost, vazduh, voda, mineralne soli, temperatura, vlažnost, hemijski sastav, itd. Ovi biotički i abiotički faktori su međusobno povezani kroz biogeochemijske cikluse elemenata kao i kroz protok energije.<sup>1</sup>

Unutar svakog ekosistema postoje staništa koja se mogu međusobno razlikovati po veličini. Stanište je prostor na kome živi određena populacija organizama. Pod populacijom se podrazumeva grupa živih organizama iste vrste koja živi na istom prostoru u isto vreme. Sve populacije međusobno interaguju čineći zajednicu. Zajednica živih bića reaguje sa neživim svetom koji se nalazi oko nje čineći ekosistem. Stanište obezbeđuje sve potrebe organizma kao što su hrana, voda, temperatura, kiseonik, mineralne materije i slično.

Postoji mnogo primera ekosistema: ribnjaci, šuma, zaliv, livada, zemljište, vazduh itd. Granice između pojedinih ekosistema nisu uvek jasne iako to na prvi pogled može tako da izgleda.

Ekologija ekosistema proučava kao glavne procese energetske transformacije i biogeochemijske cikluse. Ekosistem se može definisati kao mreža interakcija između organizama, ali i kao odnosi između organizama i njihove životne sredine.<sup>2</sup>

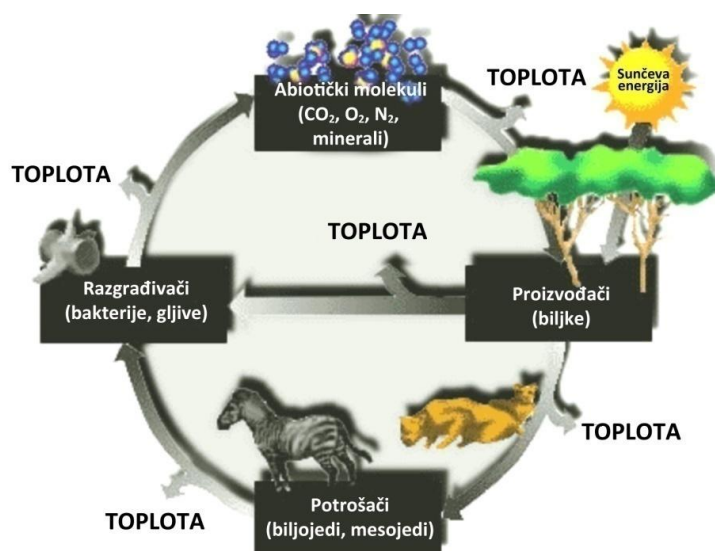
Energija, voda, azot i minerali iz zemljišta su esencijalne abiotičke komponente ekosistema. Energija koja protiče kroz ekosistem se dobija iz sunčeve energije. U ekosistem ulazi putem fotosinteze, procesa koji takođe uvodi ugljenik iz atmosfere. Biljke, životinje i mikroorganizmi igraju važnu ulogu u kretanju jedinjenja i energije kroz sistem. Razgradnjom izumrlih organizama od strane mikroorganizama dolazi do oslobađanja ugljenika i ostalih hranljivih supstanci ponovo u atmosferu gde se mogu ponovo koristiti.<sup>3</sup>

Ekologija se može posmatrati na nivou jedinke, populacije, zajednice i ekosistema. Ekologija jedinke se odnosi na fiziologiju, reprodukciju, razvoj i ponašanje, ekologija populacije se odnosi na stanište, grupna ponašanja, rast populacije, granice razvoja, a ekologija zajednice proučava kako se pojedine populacije odnose jedna prema drugoj. Ekologija ekosistema proučava funkcionisanje sistema kao celine i glavne funkcionalne aspekte sistema. Ovi funkcionalni aspekti uključuju količinu energije koja se proizvodi u procesu fotosinteze, protok energije i jedinjenja u lancu ishrane, šta kontroliše brzinu razgradnje ili recikliranje pojedinih komponenti ekosistema ili pojedinih hranljivih supstanci.

### 2.1.1. Procesi u ekosistemima

Ugljenik i energija u ekosistem ulaze u procesu fotosinteze, ugrađuju se u tkiva i prenose u druge organizme koji se hrane živim ili izumrlim biljkama. U procesu disanja se mogu ukloniti iz organizma. Većina drugih mineralnih hranljivih supstanci se takođe ponovo iskorišćavaju u ekosistemu.<sup>3</sup>

Na slici 2.1. se mogu uočiti dve osnovne ideje o funkcionisanju ekosistema: kruženje energije i kruženje materije (biogeochemijski ciklusi).



Slika 2.1. Kruženje enegije i materije u prirodi

(<http://www.globalchange.umich.edu/globalchange1/current/lectures/kling/ecosystem/ecosystem.html>, 2008)

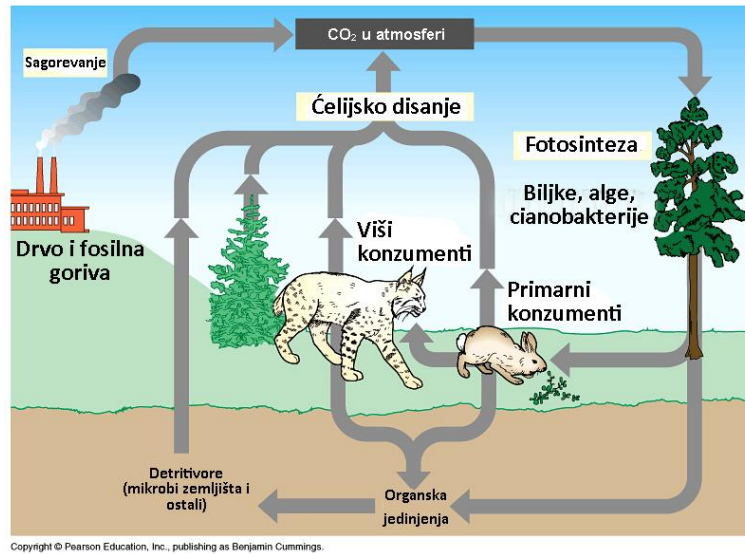
Ova dva procesa su povezana ali nisu potpuno ista. Energija ulazi u biološki sistem iz energije Sunca i pretvara se u hemijsku energiju organskih molekula u ćelijskim procesima koji uključuju fotosintezu i respiraciju i na kraju se pretvara u toplotnu energiju. Ova energija se rasipa jer se gubi u vidu toplote i kao takva se ne može više obnoviti. Bez neprestanog unosa Sunčeve energije živi sistemi bi brzo izumrli. Stoga se može smatrati da je Zemlja otvoreni sistem u odnosu na energiju.

Ugljenik i enegija, koji se ugrađuju u biljna tkiva (biljke se smatraju primarnim proizvođačima – producentima), konzumiranjem se prenose na životinje ili izumiranjem biljke dolazi do razgradnje većih molekula na jednostavnije. Smatra se da se kod kopnenih ekosistema približno 90% biljaka razgradi od strane mikroorganizama, a da je svega 10% konzumirano od strane drugih organizama.<sup>3</sup>

Elementi kao što su ugljenik, azot i fosfor ulaze u žive sisteme na različite načine. Biljke dobijaju elemente iz okolne sredine: atmosfere, vode i zemlje. Životinje takođe mogu uneti ove elemente direktno iz okoline, ali u najvećoj meri ih dobijaju konzumiranjem drugih organizama. Ovi elementi tada ulaze u sastav mnogih molekula u organizmu, ali pre ili kasnije usled izlučivanja ili odumiranja organizma vraćaju se u svoj neorganski oblik. Mikroorganizmi najčešće završavaju ovaj ciklus elemenata u procesu razgradnje ili mineralizacije. S obzirom da se elementi ne uništavaju ili gube u okviru samog sistema smatramo da je Zemlja zatvoren sistem u odnosu na mikroelemente.

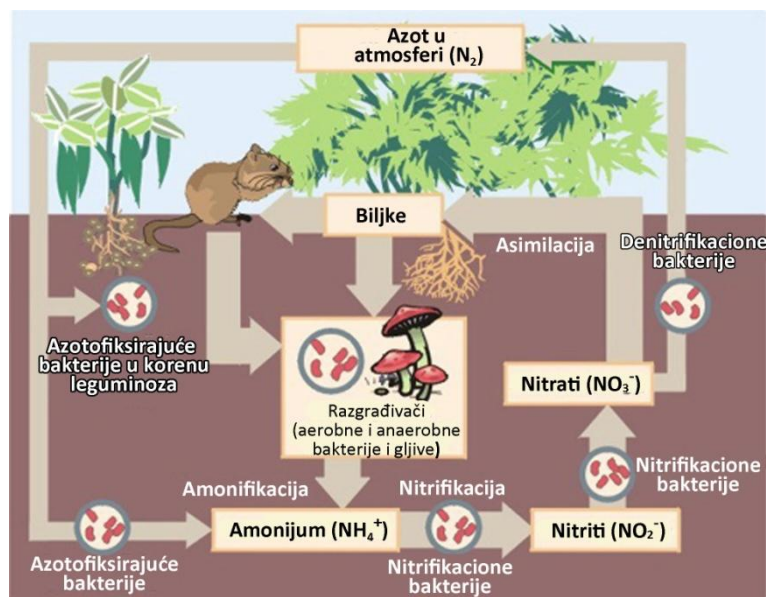
Ekosistem neprestano razmenjuje energiju i ugljenik sa svojim širim okruženjem. Sa druge strane mineralne hranljive supstance kruže između biljaka, životinja, mikroorganizama i zemljišta. Najveća količina azota ulazi u ekosistem u procesu biološke fiksacije azota ili se u zemljište unosi veštačkim đubrivom. S obzirom da su kopneni ekosistemi ograničeni po pitanju količine azota smatra se da je kruženje azota jedan od važnih kontrolnih mehanizama u ekosistemu.<sup>3</sup>

Na slikama 2.2 do 2.4 su prikazani biogeohemijski ciklusi ugljenika, azota i fosfora.



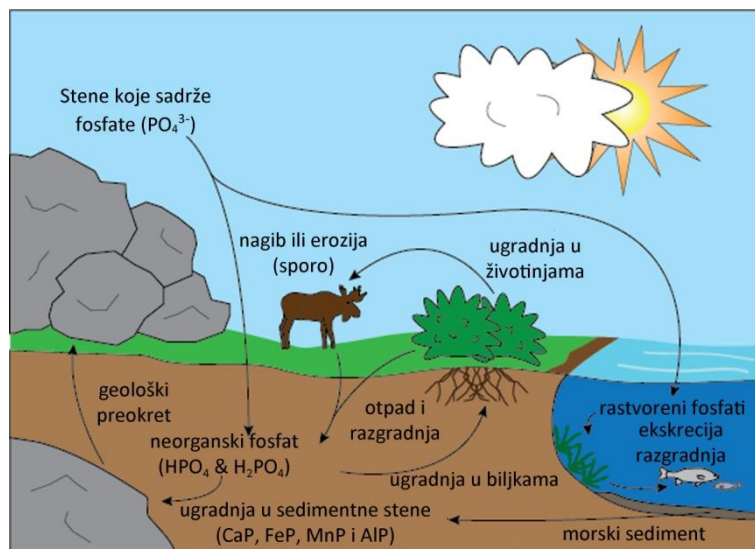
Slika 2.2. Kruženje ugljenika u prirodi

([http://shawmst.org/biology/chapter/what\\_do\\_we\\_need\\_to\\_eat/](http://shawmst.org/biology/chapter/what_do_we_need_to_eat/))



Slika 2.3. Kruženje azota u prirodi

(<http://sosc.poly.edu/curriculum/nitrogen-cycle/>)



Slika 2.4. Kruženje fosfora u prirodi

(<http://www.shmoop.com/ecology/phosphorus-cycle.html>)

Ekosistemi pružaju veliki broj raznih materijalnih dobra i raznih »usluga« koji su neophodni čoveku. U materijalna dobra se ubrajaju »opipljivi materijalni proizvodi« koje proizvodi ekosistem, kao na primer hrana, gradivni materijal, lekovite biljke<sup>4</sup>, ali i manje opipljivi proizvodi kao što su turizam, rekreacija kao i geni divljih životinja i biljaka koji se mogu koristiti za poboljšanje domaćih vrsta.<sup>5</sup> U usluge koje pruža ekosistem se mogu ubrajati sve one koje poboljšavaju životne uslove, kao što su održavanje ciklusa vode, prečišćavanje vazduha, vode i zemljišta, održavanje količine kiseonika u atmosferi, oprašivanje useva.<sup>4,5</sup>

### 2.1.2. Upravljanje ekosistemima

Kada se upravljanje prirodnim resursima primeni na ceo ekosistem, a ne na samo jednu vrstu onda se to naziva »upravljanje ekosistemom«.<sup>6</sup> Kod upravljanja ekosistemom postoji nekoliko uobičajenih principa: dugotrajna održivost dobara i usluga ekosistema, jasno ekološko razumevanje sistema uključujući povezanost i ekološku dinamiku i razumevanje uloge ljudi kao komponente ekosistema.<sup>5</sup>



### 2.1.3. Tipovi ekosistema

Usled abiotičkih faktora različiti ekosistemi se razvijaju na različite načine. Ovi faktori i njihove međusobne interakcije kao i interakcije sa biotičim komponentama dovele su do stvaranja različitih vrsta ekosistema. Iako se u različitoj literaturi pominje više vrsta ekosistema u suštini postoje samo kopneni i vodeni ekosistem.

#### *i. Kopneni ekosistemi*

Kopneni ekosistemi su međusobno prilično raznovrsni i mogu se klasifikovati u

1. **Šumski ekosistemi.** Ekosistemi u kojima živi veliki broj organizama na relativno malom prostoru. Male promene u ovom ekosistemu mogu znatno uticati na balans i uništenje ekosistema.
2. **Pustinjski ekosistemi.** Ekosistemi u kojima ima veoma malo padavina. Zauzimaju oko 17% sve zemlje na planeti. Usled ekstremnih temperatura, nedostatka vode i intenzivnog sunčevog zračenja flora i fauna su retki i slabo razvijeni.
3. **Travnati ekosistemi.** Travnati ekosistemi se nalaze kako u tropskom, tako i u umerenom području i dele se na savane i prerije.
4. **Planinski ekosistemi.** Flora i fauna ovog ekosistema se razlikuje u zavisnosti od nadmorske visine.

#### *ii. Vodeni ekosistemi*

Postoje dve vrste vodenih ekosistema:

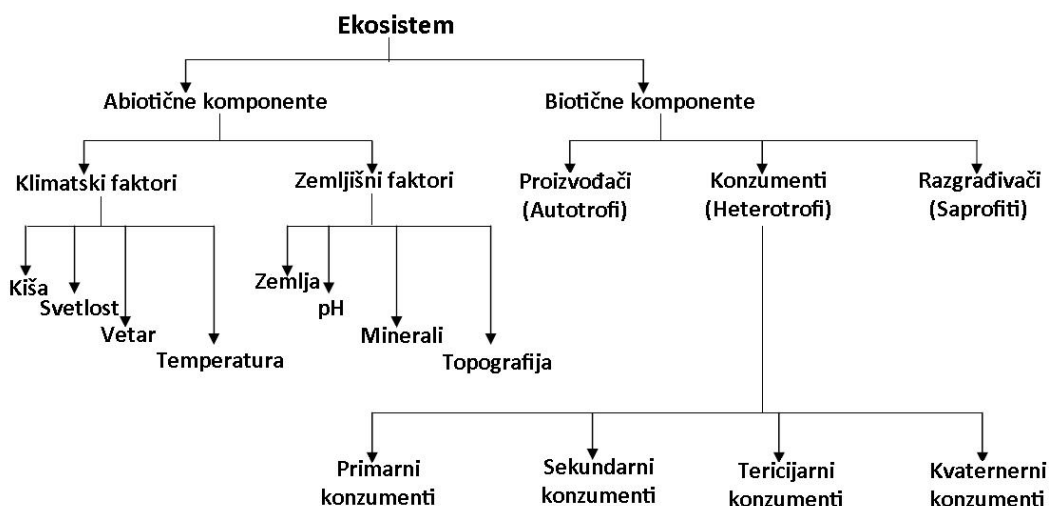
1. **Morski ekosistemi.** Ovi ekosistemi su najrasprostranjeniji od svih ekosistema i pokrivaju približno 71% površine Zemlje i sadrže oko 97% planetarne vode.

Voda u ovim ekosistemima sadrži soli i minerale rastvorene u velikim količinama.

2. **Slatkovodni ekosistemi.** Za razliku od morskih slatkovodni ekosistemi pokrivaju 0,8% Zemljine površine i sadrže svega 0,009% ukupne vode.

### 2.1.4. Strukturne i funkcionalne komponente ekosistema

Struktura i odnosi između komponenti sistema su prikazani na slici 2.5



Slika 2.5. Komponente ekosistema

## 2.2. ZEMLJIŠTE KAO DEO EKOSISTEMA

Zemljište je važan faktor koji utiče na razvoj i produktivnost različitih ekosistema naše planete. Mnogi oblici života zavise od zemljišta, kao što su vaskularne biljke, a njihov razvoj i rast dalje utiče na ostale organizme iz lanca ishrane. Iako je važnost zemljišta bila poznata oduvek, tek poslednjih nekoliko decenija se zemljište ispituje u naučnom smislu.<sup>7</sup>

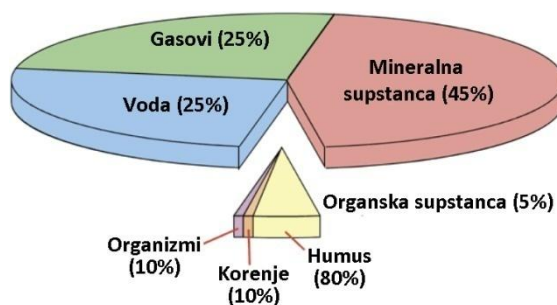
Pojam zemljišta nije lako definisati i postoji više definicija. Hilgard [8] definiše zemljište kao »manje ili više rastresit i trošan materijal u kome biljke putem korena

mogu da pronađu uporište i druge uslove rasta«. Ova definicija zemljišta je prilično zastarela, ali se i dalje koristi. Jedna je od mnogih gde se značaj zemljišta ističe samo u smislu rasta i razvoja biljaka. Raman<sup>9</sup> definiše zemljište kao »površinski sloj čvrstog zemljinog prekrivača«. Džofe<sup>10</sup>, predstavnik ruske škole, smatra da Ramanova formulacija ne razlikuje zemljište od stenovitih materijala. Prema njemu, zemljište je prirodno diferencirano u slojeve od minerala i organskih supstanci, obično je rastresito u zavisnosti od dubine. Od matičnog sloja koji se nalazi u nižim slojevima se razlikuje u morfologiji, fizičkim svojstvima i konstituciji, hemijskim svojstvima i sastavu, kao i po biološkim karakteristikama.<sup>7</sup>

Zemljište kao stanište se može definisati kao skup živih organizama koji ga naseljavaju, znači biljke, životinje i mikroorganizme, kao i njihovo abiotičko okruženje.<sup>11</sup>

### 2.2.1. Sastav zemljišta

Zemljište je veoma kompleksne građe i sadrži vazduh, vodu, organske supstance i razne vrste živih organizama (slika 2.6.), a formiranje zemljišta je pod uticajem klime, živih organizama, materijala ispod površine zemljišta kao i vremena.



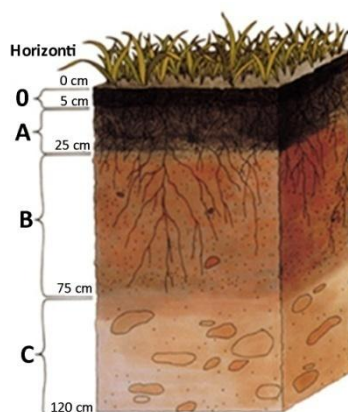
Slika 2.6. Sastav zemljišta

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

Gornjom granicom zemljišta smatra se linija između zemljišta i vazduha, plitke vode, živih biljaka ili biljnog materijala koji nije počeo da se raspada. Na nekim mestima nije moguće odrediti granice zemljišta, jer se dešava tako postepeno da skoro i ne postoji granica. Donja granica zemljišta je teža za određivanje. Obično se donjom granicom smatra deo ispod zemljišta gde više ne postoje životinje, korenje ili drugi znaci biološke aktivnosti. Najnižu tačku gde ne postoji biološka aktivnost teško je odrediti, jer se

prelaz dešava postupno. Ova donja granica može se proizvoljno postaviti na 200 cm. Ukoliko materijal ispod ove granice utiče na kvalitet zemljišta ili vode i on se uzima kao deo opisanog uzorka.<sup>12</sup>

Vremenom, jednostavna mešavina peska, mulja, gline i organskih supstanci će prerasti u zemljišni profil koji se sastoji od dva ili više slojeva koji se nazivaju horizonti. Oni se međusobno razlikuju po teksturi, strukturi, gustini, poroznosti, temperaturi, boji, debiljini i reaktivnosti. Horizonti međusobno nemaju oštre granice. Zrelo zemljište u regionima sa umerenom klimom ima tri glavna horizonta, koji su na slici 2.7. označeni sa A, B i C.



Slika 2.7. Profil zemljišta

Horizonti A i B se drugačije nazivaju i »*solum*« ili »pravo zemljište«, s obzirom da se najveći broj hemijskih i bioloških aktivnosti dešavaju upravo u ovim slojevima.<sup>13</sup> U područjima gde je klima tropska zemljište može da ima samo jedan horizont.

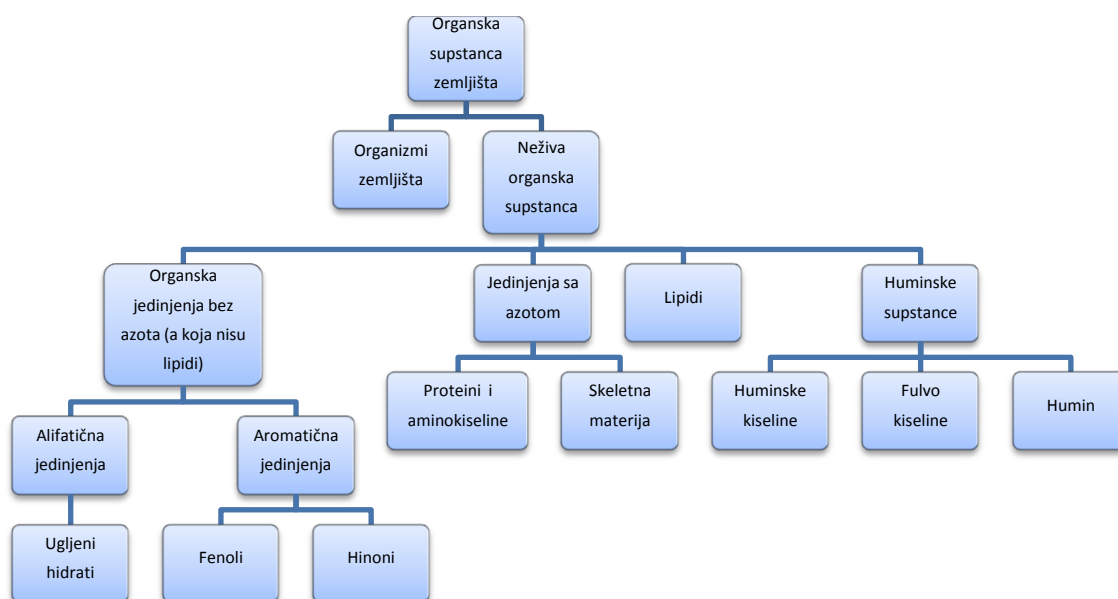
### 2.2.2. Organska supstanca zemljišta

Pod pojmom organska supstanca zemljišta se podrazumeva ukupan organski materijal u zemljištu, uključujući makroorganski materijal koji je razbacan na površini zemljišta (eng. *litter*) i koji je neophodan za kruženje hranljivih supstanci u šumama i livadama, zatim lake frakcije (biljni ostaci u različitim fazama raspadanja), mikrobn biomasa (najzastupljenije su bakterije, aktinomicete, gljive, alge i protozoe), organske supstance rastvorne u vodi i stabilizovana organska materija – *humus*.<sup>14</sup>

Humus je glavni faktor koji određuje karakter profila zemljišta i koji je uglavnom skoncentrisan u gornjim slojevima zemljišta (na dubini do 15 cm). Jedna od mnogih definicija humusa glasi da je humus »složena i prilično otporna mešavina braon ili tamno braon amorfnih i koloidnih organskih jedinjenja koja nastaju prilikom mikrobiološke razgradnje većih molekula, ali i prilikom mikrobioloških sinteza. Ova mešavina ima veoma značajnih hemijskih i fizičkih osobina za zemljište i organizme koji tu žive«. <sup>15</sup>

Humus predstavlja proizvod raspadanja raznih površinskih otpadnih materija (eng. *litter*) ali i proizvoda razlaganja korenja. Kod prosečnog zemljišta humus sadrži oko 4-6% organske supstance koja je sastavljena od mrtve materije (oko 85% od organske supstance), živog korenja i korenčića (oko 8,5%) i živih organizama (oko 6,5%). <sup>15</sup>

Uloga organske supstance zemljišta je njen značaj u rastu biljaka kroz efekat na fizičke, hemijske i biološke osobine zemljišta. Organska supstanca ima i nuticioni efekat u kome služi kao izvor azota, fosfora i sumpora neophodnih za rast biljaka. Biološka funkcija organske supstance je njen značajan efekat na aktivnost mikroflore i mikrofaune, ali i fizička funkcija u stvaranju dobre strukture zemljišta, pri čemu se povećava aeracija i retencioni vodeni kapacitet. <sup>14</sup>



Slika 2.8. Klasifikacija organske supstance zemljišta <sup>15</sup>

### 2.2.3. Organizmi zemljišta<sup>15</sup>

Živi organizmi se prema svojoj veličini mogu podeliti na makrofaunu, mezofaunu i mikroorganizme (mikrofaunu i mikrofloru). Makrofauna uključuje mekušce, bube, larve velikih insekata, kao neke kičmenjake koji žive pod zemljom i hrane se manjim organizmima.

Mezofaunu čine četiri osnovne grupe:

- Nematode. Nesegmentisani valjkasti crvi koji dostižu veličinu od 0,5-1 mm. U zemljištu površine 1 m<sup>2</sup> i dubine 30 cm nalazi se između 10<sup>6</sup> – 2 x 10<sup>7</sup> ovih organizama.
- Artropode. Obuhvataju više kategorija. Tu spadaju grinje, heksapode (ali ne insekti), stonoge, biljne uši, bube, larve insekata i termiti
- Anelide. Segmentisani crvi, kišne gliste.
- Mekušci. Dužine od 2-20 mm. Uključuju puževe.

Mikroorganizmi se najčešće dele u četiri grupe:

- Bakterije. To su jednoćelijski organizmi čija je veličina ćelije između 0,1 i 20 mikrona. Zbog velike brzine razmnožavanja u jednom m<sup>3</sup> zemljišta se nalazi oko 10<sup>12</sup>-10<sup>15</sup> ćelija. Efekti bakterija u zemljištu su veoma veliki, jer oni razlažu veliki broj različitih materijala pod različitim uslovima, npr. oksidacija redukovanih jedinjenja sumpora pomoću *Acidithiobacillus ferrooxidans* ili stvaranje azotofiksirajućih čvorića na korenju leguminoza od strane *Rhizobium sp.* Neke bakterije su sposobne da metabolišu široki spektar hemijskih supstanci (npr. *Pseudomonas* koji metaboliše pesticide).
- Gljive. Zavisno od toga da li koriste mrtvi organski materijal ili živi organizam gljive mogu biti saprofitske ili parazitske. Imaju filamentoznu strukturu (hife) čiji je prečnik oko 0,5-10 μm i koje grade gustu mrežu – micelijum. Rastu uglavnom na površini zemljišta pre svega gde su kiselijni uslovi. Neke gljive žive kao simbionti na tkivu biljaka. Ukoliko su povoljni

uslovi (pre svega kiselost) mogu biti odgovorne za razgradnju i do 80% organske supstance zemljišta.

- Alge. Fotosintetski organizmi ograničeni na gornje slojeve zemljišta.
- Protozoe. Žive na vodenom filmu koji obuhvata čestice zemljišta. Kontrolišu broj bakterija i gljiva.

#### 2.2.4. Neživi organski materijal

Organski materijal zemljišta koji se formira metaboličkim delovanjem organizama zemljišta, ali i razlaganjem organske supstance se može podeliti u četiri klase (Slika 2.8.):

- Organska jedinjenja koja u svojoj strukturi ne sadrže azot (a koja nisu lipidi)
- Jedinjenja azota
- Lipidi
- Složena jedinjenja, uključujući huminske supstance

Raspadanje organskog materijala u zemljištu se može podeliti u nekoliko faza. Zemljišne gliste, crvi i sl. igraju važnu ulogu u smanjenju količine ostataka biljaka u okviru litera i lake frakcije. Za dalje transformacije su odgovorni mikroorganizmi. U početnoj fazi mikrobiološkog razlaganja karakterističan je brz gubitak lako razgradivih organskih supstanci, pri čemu nastaju i sporedni proizvodi kao što su CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, organske kiseline i druge nepotpuno oksidovane supstance. U narednih nekoliko faza razgrađuju se intermedijeri i novoformirana mikrobna biomasa od strane velikog broja mikroorganizama. U poslednjoj fazi dolazi do postupne razgradnje otpornijih delova biljaka (kao što je lignin) u kojoj aktinomicete i gljive igraju najznačajniju ulogu.<sup>14</sup>

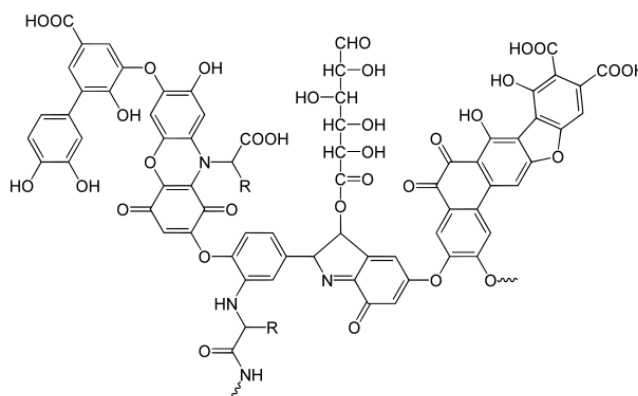
#### 2.2.5. Huminske supstance

Huminske supstance obuhvataju kompleksnu, amorfnu smešu visoko heterogenih, hemijski reaktivnih, otpornih molekula koji su stvoreni tokom rane diagenese (procesa stvrdnjavanja sedimenata) u toku raspadanja biološkog materijala u životnoj sredini u

procesima kao što su hemijske reakcije raznih vrsta i hemijskim promenama prekursornih molekula.<sup>16</sup>

Termin huminske supstance označava klasu organskih jedinjenja koja se nalaze ili su ekstrahovane iz raspadnutog biološkog materijala (biološki sintetizovan materijal koji više nije živ ili deo živih ćelija) u zemljištu, sedimentima ili prirodnim vodama, a pri tom ne spadaju ni u jednu određenu klasu organskih supstanci.<sup>16</sup>

Huminske supstance se mogu definisati kao prirodne organske supstance koje su bogate azotom i koje nastaju bakterijskim razlaganjem biljnih i životinjskih ostataka. One uključuju složena jedinjenja (slika 2.9.) koja još nisu u potpunosti istražena i koja imaju razne nijanse braon i žute boje.<sup>15</sup>



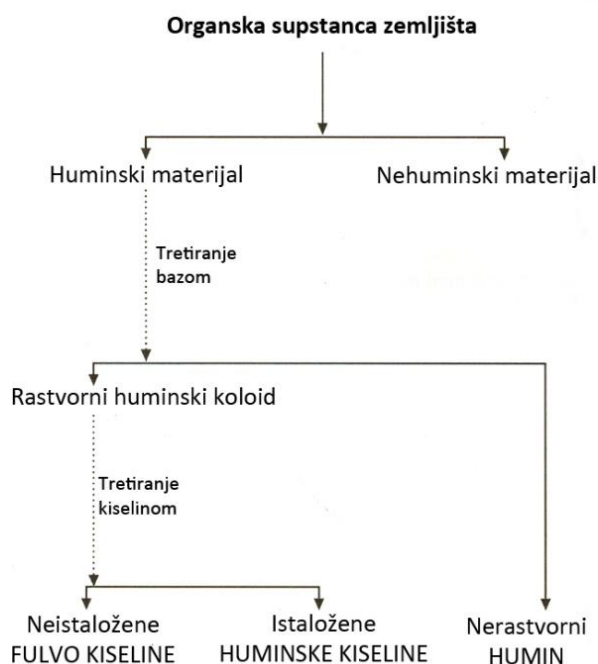
Slika 2.9. Primer složene strukture huminske kiseline<sup>14</sup>

Huminske supstance obuhvataju tri glavne frakcije:

- Huminske kiseline
- Fulvo kiseline
- Humin

Veličina ovih molekula je od 6-50 nm i nemaju jedinstvenu strukturnu formulu. Molekulske mase huminskih supstanci se kreću od 1 500 do 30 000 Da. Frakcije huminskih supstanci se međusobno razlikuju po svojoj rastvorljivosti u vodi na različitim pH vrednostima (Slika 2.10.).





Slika 2.10. Frakcionisanje huminskih supstanci

Jedna od najvažnijih karakteristika huminskih i fulvo kiselina je njihova naglašena hemijska reaktivnost. Huminske supstance imaju veliki broj karboksilnih grupa i sadrže slabo kisele fenolne grupe. Ove grupe doprinose i sposobnosti građenja kompleksa i jonoizmenjivačkim osobinama huminskog materijala. Huminske supstance su takođe poznate kao redoks aktivni materijal, a ova osobina je igra važnu ulogu u geohemijskim i procesima važnim za životnu sredinu.<sup>16-18</sup> Osim toga, reč je supstancama koje sadrže slobodne radikale i mogu da vezuju male molekule vodoničnim vezama i nepolarnim interakcijama.<sup>16,19</sup>

Huminske supstance pokazuju i hidrofobni i hidrofilni karakter. U svojoj strukturi imaju (pored pomenutih karboksilnih i fenolnih grupa) i benzenove prstene, alifatične segmente, pentozne i heksozne strukture, aminokiseline, hidroksilne grupe i slično.<sup>16</sup>

Značaj huminskih kiselina se ogleda u geohemiji i u životnoj sredini iz sledećih razloga<sup>14</sup>:

1. Uključene su u prenos i koncentrovanje raznih mineralnih supstanci.

2. Služe kao nosači organskih ksenobiotika (kao i elemenata u tragovima) u prirodnim vodama. Huminske supstance same po sebi nemaju negativnih fizioloških efekata, ali su estetski neprihvatljive pošto utiču na crveno-crnu boju pitke vode i jezera koja služe za rekreaciju. Huminske supstance igraju važnu ulogu u smanjenju toksičnih efekata teških metala (kao što su  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Al}^{3+}$ ) na vodene organizme uključujući ribe.
3. Deluju kao oksidujuća i redukujuća sredstva u zavisnosti od sredine. Mogu uticati na fotohemijske procese u prirodnim vodama, uključujući delovanje na ksenobiotike.
4. Kapacitet zemljišta da vezuje različite gasove je pod uticajem humusa.
5. Supstance slične huminskim supstancama koje nastaju pri tretmanu otpadnih voda sekundarnim biološkim procesima stvaraju velike probleme jer reaguju sa hlorom stvarajući kancerogeni hloroform i druga neželjena halogenovana organska jedinjenja.

### *i. Huminske kiseline*

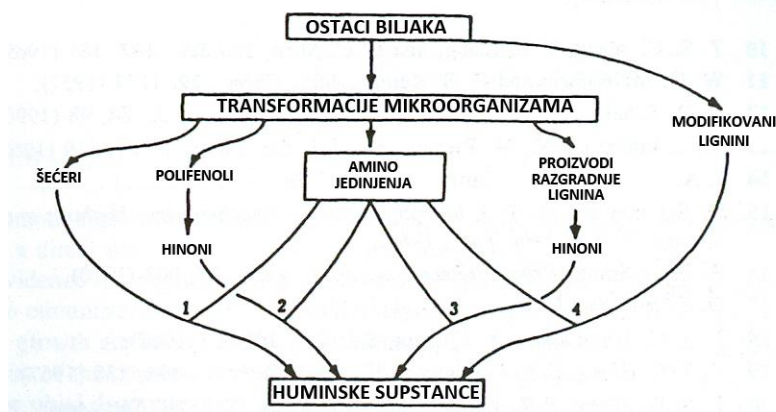
Huminske kiseline su supstance braon ili sivo-crne boje i iz zemljišta se mogu ekstrahovati baznim rastvaračima. Prvi put se pominju 1786. godine od strane Achard-a koji ih je ekstrahovao iz tresetišta kod Berlina i uložio mnogo vremena u proučavanju njihovih osobina i dešifrovanju njihovog porekla i načina stvaranja.

Huminske kiseline i slične supstance spadaju u najzastupljeniji organski materijal na zemlji. Osim u zemlji nađene su i u prirodnim i otpadnim vodama, kompostu, sedimentima mora i jezera, tresetu, škriljcima, lignitu i drugim vrstama uglja, kao i u drugim depozitima.

#### Teorije o nastanku huminskih kiselina

Biohemija stvaranja huminskih kiselina je jedna od najslabije istraženih oblasti hemije humusa, ali i jedna od onih koja privlače najviše zanimanja.

Postoji nekoliko puteva koji opisuju stvaranje huminskih supstanci u toku raspadanja neživih biljaka i životinja u zemljištu, a najvažnije su predstavljene na slici 2.11.



Slika 2.11. Mehanizmi stvaranja huminskih supstanci.

Po klasičnoj teoriji koju je razvio Waksman huminske supstance predstavljaju modifikovane lignine (put 4), ali najveći broj današnjih istraživača favorizuje mehanizam koji uključuje hinone (putevi 2 i 3). U praksi sva četiri puta se moraju razmatrati kao mehanizmi za sintezu huminskih i fulvo kiselina u prirodi uključujući i teorija o kondenzaciji aminošećera (put 1). Amino jedinjenja verovatno reaguju sa modifikovanim ligninima (put 4), hinonima (putevi 2 i 3) i redukujućim šećerima (put 1).

Nijedna od teorija danas nije u potpunosti prihvaćena, ali ni u potpunosti opovrgnuta. U razmatranju porekla huminskih supstanci mora se naglasiti da potpuno zadovoljavajuća šema koja bi objasnila prirodu i stvaranje huminskih i fulvo kiselina u različitim ekosistemima još nije u potpunosti razvijena. Sva četiri puta koja su pokazana na slici 2.11. mogu biti prisutna u svim vrstama zemljišta, ali ne sa istim intenzitetom i sa istim značajem. Ligninski put može biti dominantan u vlažnim zemljištima i sedimentima, dok je sinteza iz polifenola značajnija u šumskom zemljištu. Česte i oštre fluktuacije temperature, vlage u područjima sa kontinentalnom klimom dolazi do stvaranja humusa kondenzacijom aminošećera.<sup>14</sup>

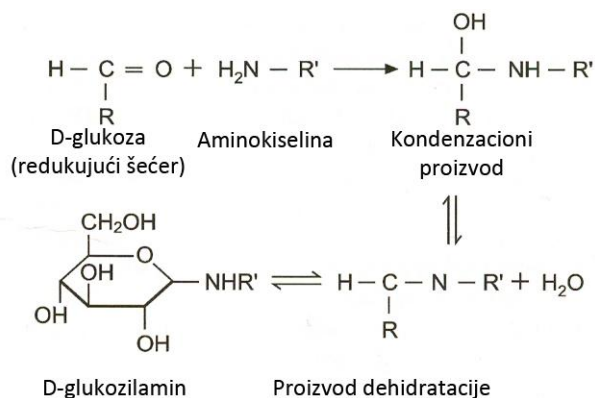
Smatra se i da u jednom zemljištu ne nastaju sve huminske supstance po istom mehanizmu. Na primer, huminske kiseline mogu poticati od biljnih i polifenola mikroorganizama, dok fulvo kiseline mogu poticati od kondenzacije šećera i amina.<sup>14</sup>

U nekim slučajevima nijedna od navedenih teorije ne opisuje adekvatno nastajanje huminskih supstanci. Pre svega se to odnosi na životnu sredinu bez (ili sa veoma malo) proizvedenih aromatičnih sastojaka. Takve sredine su morski i okeanski sedimenti. U ovim slučajevima se smatra da huminske supstance nastaju od nezasićenih masnih kiselina koje je proizveo plankton.<sup>14,20</sup>

### *Teorija o kondenzaciji amino-šećera*

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

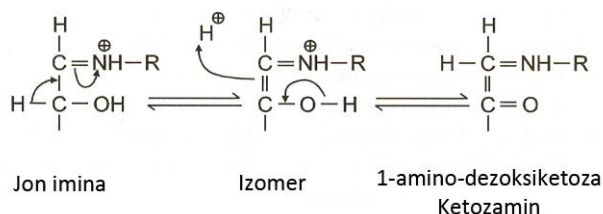
1. Početna faza (stvaranje glikozida). Kondenzuju se karbonilna grupa aldoze i slobodna amino grupa aminokiseline (Maillard-ova reakcija) dajući N-supstituisani glikozilamin:



Slika 2.12. Početna faza (Maillard-ova reakcija)

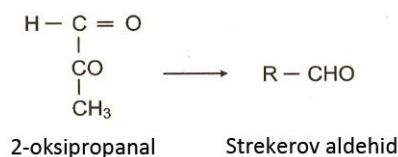
U ovoj fazi se ne javlja braon boja.

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



Slika 2.13. Stvaranje keto-amina (Amadori premeštanje)

3. Završna faza (stvaranje reaktivnih supstanci koje polimerizacijom prelaze u tamno-braon huminske kiseline). U ovoj fazi keto-amini se fragmentišu do hidroksiacetona ili 2-oksopropanala koji se dalje degradira do tzv. Strekerovog aldehida:



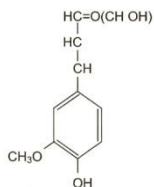
Slika 2.14. Stvaranje Strekerovog aldehida

Ova jedinjenja su veoma reaktivna i polimerizuju se do makromolekula huminskih kiselina. Međutim, mnogi istraživači su smatrali da se u prirodnom okruženju šećeri veoma brzo iskoriste od strane mikroorganizama i da zato ne mogu biti prekursori za stvaranje huminskih kiselina.

### *Ligninska teorija*

Mnogo godina je smatrano da huminske supstance potiču od lignina (put 4, slika BR. – Mehanizmi stvaranja huminskih supstanci). Po toj teoriji lignin se nepotpuno razgrađuje od strane mikroorganizama i postaje deo humusa. Modifikacije lignina uključuju gubitak metoksi (OCH<sub>3</sub>) grupa pri čemu se stvaraju *o*-hidroksilfenoli, a oksidacijom alifatičnog dela lanca nastaju COOH grupe.

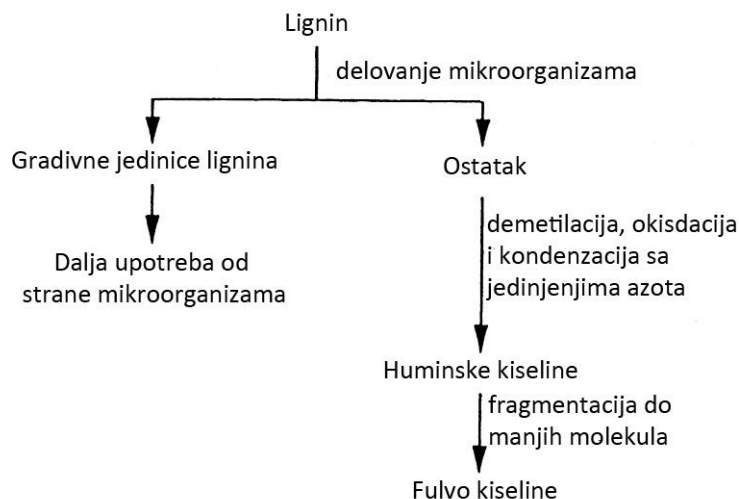
Po ovoj teoriji, koju je razvio Waksman 1932. godine<sup>15,21</sup> lignin predstavlja glavnog prekursora u stvaranju huminskih kiselina. Ova teorija je dominirala do 50-ih godina prošlog veka. Lignin predstavlja komponentu ćelijskog zida biljaka. To je polimer sa aromatičnom strukturom i sastoji se od fenil propanskih monomera (Slika 2.15.).



Slika 2.15. Ligninski monomer

Određene vrste gljiva mogu u potpunosti da razgrade lignin, jer proizvode lignolitičke enzime koji oksidišu fenil propanske monomere.<sup>22</sup>

Prema Waksman-u fragmentacija makromolekula lignina je praćena uklanjanjem metil grupa, oksidacijom i kondenzacijom sa N-jedinjenjem pri čemu se grade huminske kiseline (Slika 2.16.)



Slika 2.16. Nastajanje huminskih kiselina iz lignina<sup>14</sup>

U prilog ove teorije idu i sledeće činjenice:

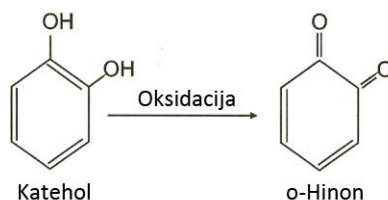
- Najveći broj gljiva i bakterija mogu da razgrađuju lignin i huminske kiseline.
- Oba polimera (lignin i huminske kiseline) su rastvorni u alkoholu i piridinu, što ukazuje na određen stepen sličnosti.
- Oba polimera su rastvorna i u bazama, a talože se kiselinama. Oba imaju kiselu prirodu.
- Zagrevanjem lignina sa vodenim rastvorom baze dobijaju se metoksil-huminske kiseline.
- Huminske kiseline i oksidovani lignin imaju slične osobine.

Danas se ova teorija smatra zastarelom iako lignin i dalje igra ključnu ulogu u teorijama koje su kasnije postavljene, a i danas ih podržava veliki broj istraživača.

### *Polifenolna teorija*

Za razliku od Ligninske teorije, polazni materijal u ovom slučaju se sastoji od organskih jedinjenja niskih molekulskih masa, a od njih mogu nastati veliki molekuli u procesu kondenzacije i polimerizacije.

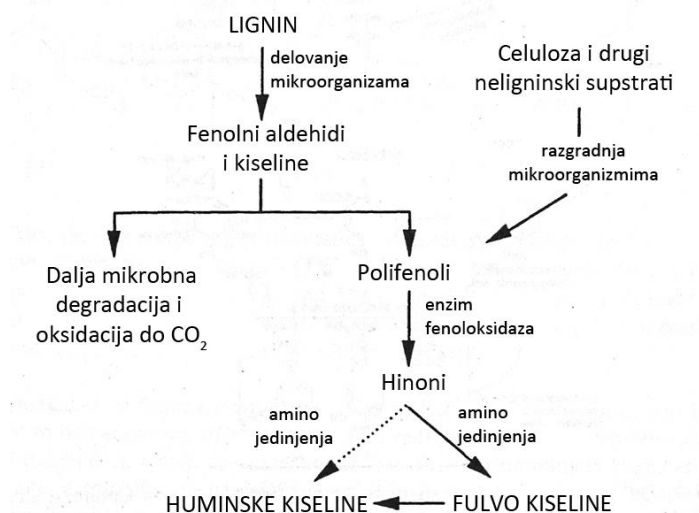
Polifenoli su hemijske supstance koje se uglavnom nalaze u biljkama dajući nekim cvetovima i povrću karakterističnu boju. U hemijskom smislu to su fenolna jedinjenja koja imaju više od jedne hidroksilne grupe. Primer je katehol (Slika. 2.17.).



Slika 2.17. Stvaranje *o*-hinona oksidacijom iz polifenola (katehola)

Hinoni mogu da se dalje kondenzuju sa amino jedinjenjima (npr. proteinima i ostalim makromolekulima) stvarajući tamno obojene komplekse visokih molekulskih masa sličnih huminskim kiselinama. Zato je moguće zamisliti sličan proces kojim bi lignin,

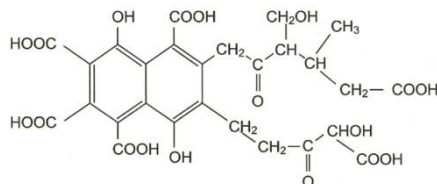
celuloza i ostali kompleksi polisaharida mogli biti tretirani od strane mikroorganizama dajući fenolne aldehide i kiseline od kojih nastaju polifenoli. Oksidacijom polifenola uz pomoć mikrobnog enzima fenoloksidaze nastaju hinoni.<sup>15</sup> Njihovom kondenzacijom sa amino jedinjenjima stvaraju se huminske kiseline. Ceo proces se šematski može prikazati kao na slici 2.18.



Slika 2.18. Polifenolna teorija<sup>14</sup>

## ii. Fulvo kiseline

Fulvo kiseline predstavljaju frakciju huminskih supstanci koje ostaju u rastvoru nakon zakišeljavanja alkalnog rastvora (huminske kiseline se talože na pH vrednostima manjim od 2). Fulvo kiseline su mnogo manje proučavane od huminskih kiselina. To su braon obojene kisele supstance. Po nekim autorima se preporučuje model fulvo kiselina koji sadrži aromatične i alifatične strukture sa velikim brojem  $-COOH$  i  $-OH$  funkcionalnih grupa.



Slika 2.19. Model strukture fulvo kiselina<sup>15</sup>



Proces formiranja fulvo kiselina je sličan procesu formiranja huminskih kiselina (Ligninska teorija) pri čemu fulvo kiseline nastaju fragmentacijom huminskih kiselina na manje molekule. Po polifenolnoj teoriji one nastaju direktno iz hinona (paralelno sa huminskim kiselinama). Odnos huminskih i fulvo kiselina zavisi od vrste zemljišta.

### *iii. Odnos huminskih i fulvo kiselina*

Procenat humusa koji se nalazi u različitim huminskim frakcijama znatno varira u zavisnosti od zemljišta. Humus u šumskom zemljištu uopšteno ima manji odnos huminskih/fulvo kiselina u odnosu na humus treseta i zemljišta livada.<sup>14</sup>

Takođe ovaj odnos nam ukazuje i na razlike u hemijskom sastavu. Naime, manji odnos huminskih/fulvo kiselina ukazuje na manju aromatičnost huminskih kiselina i njihovu veću sličnost sa fulvo kiselinama. Huminske kiseline iz šumskog zemljišta imaju niži sadržaj ugljenika, ali viši zadržaj vodonika u odnosu na zemljište travnatih terena.

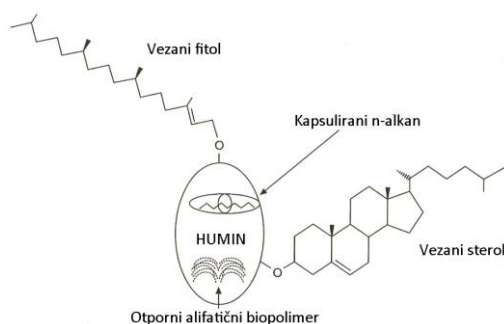
### *iv. Humin*

Humin je stabilna frakcija huminskog materijala koja je nerastvorna na bilo kojoj pH vrednosti. Obično čini najdominantniji organski materijal u najvećem broju zemljišta i sedemenata.<sup>15</sup> Organski ugljenik humina predstavlja više od 50% od ukupnog organskog ugljenika zemljišta. Značajan broj organskih zagađivača (npr. pesticida, herbicida, polihlorovanih bifenila – PFC-a) se brzo vezuju, najčešće ireverzibilno za humin.

Nerastvorljivost humina dovodi do slabog razumevanja njegovih hemijskih osobina. Uprkos velikom napretku u oblasti analitičkih tehnika kao što su razvoj infracrvene spektroskopije i gasne hromatografije još nije pronađen opšte prihvaćen model strukture za sve dobijene huminske supstance. Ipak neki autori su pokušali da naprave privremeni model humina<sup>23,24</sup> koji se zasnivaju na pretpostavci da se humin sastoji uglavnom od nekoliko komponenti:

- Otpornih lančanih polimera, alkana i alkena koji imaju specifičnu voštanu strukturu zatvorenu (kapsuliranu) u huminski matriks.
- Jedinjenja vezana za huminski matriks (sterol i fitol), koja najverovatnije potiču od hlorofila i drugog biljnog materijala.

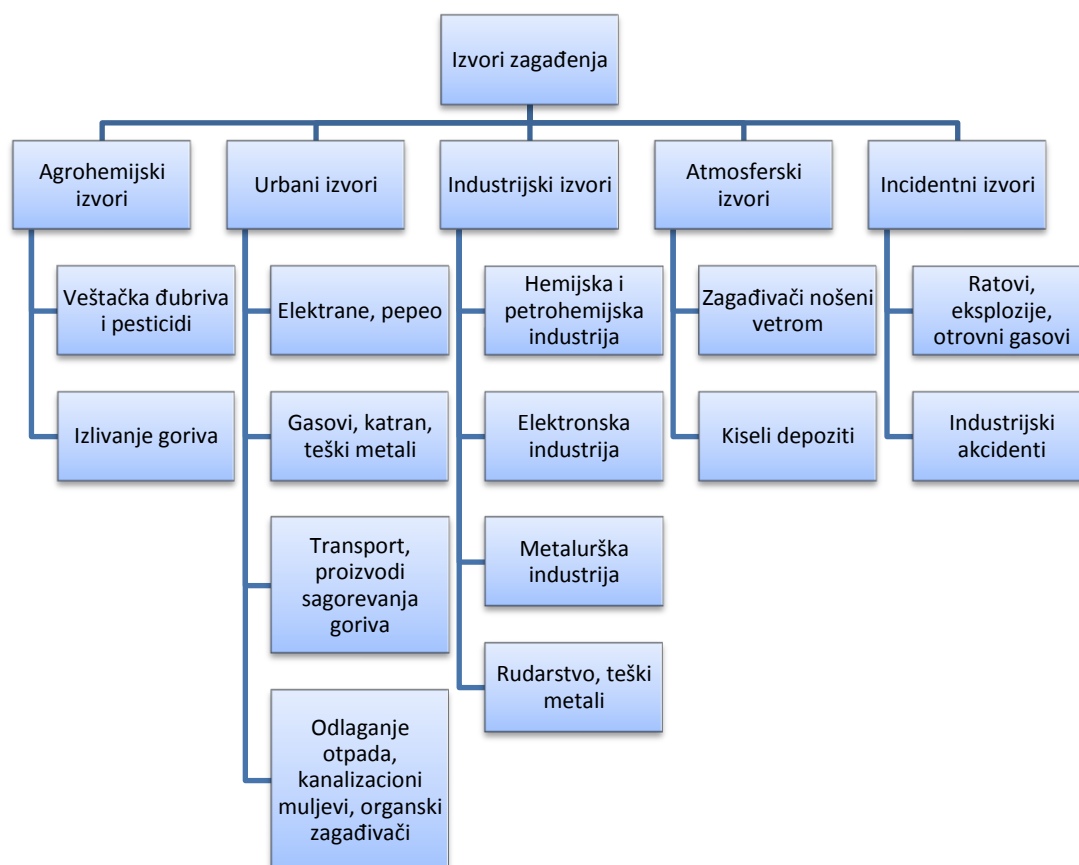
Uprkos činjenici da ništa ne ukazuje na vezu između ovih molekula autor<sup>24</sup> sugeriše na privremeni model strukture humina prikazan na slici 2.20.



Slika 2.20. Privremeni model humina koji je predložio Lichtfouse<sup>24</sup>

### 2.3. IZVORI ZAGAĐENJA ZEMLJIŠTA

Zagađenje zemljišta može poticati iz mnogih izvora. To mogu biti diskretni i tačkasti izvori zagađenja, difuzioni izvori, zagađenja usled đubrenja, akcidentne situacije kao što je izlivanje nafte. Na slici 2.21. su navedeni glavni izvori zagađenja zemljišta.

Slika 2.21. Izvori zagađenja zemljišta<sup>15</sup>

### 2.3.1. Zagađenje staništa naftom, naftnim derivatima i drugim organskim zagađivačima

Zagađenja životne sredine naftom i njenim derivatima i narušavanja prirodne ravnoteže rezultat je slučajnog izlivanja prilikom eksploatacije, transporta, prerade, skladištenja i upotrebe. Kontaminanti dospevaju na zemljište uglavnom njihovom nemarnom primenom, prosipanjem i curenjem, kao i atmosferskom depozicijom. Samo 10% zagađenja potiče od velikih incidentnih izlivanja, koji uslovljavaju kontaminaciju mora, jezera ili vodotokova i privlače značajnu medijsku pažnju. Procenjuje se da oko 5 miliona tona sirove nafte i njenih derivata dospe u životnu sredinu svake godine kao rezultat antropogenih aktivnosti, od kojih 2,3 miliona tona dospeva u mora i okeane.<sup>25,26</sup>

Organski zagađivači se mogu podeliti na<sup>28</sup>:

- alifatične ugljovodonike (npr. alkane koji se oslobađaju pri izlivanju nafte ili nastaju aktivnošću petrohemijske industrije),
- aliciklične ugljovodonike,
- aromatične ugljovodonike (npr. monoaromatični petrohemijski rastvarači benzen i toluen ili poliaromatični piren),
- hlorovani alifatični ugljovodonici (hloroform)
- hlorovani aromati (polihlorofani bifenili - PCB, DDT i dioksini),
- aromati koji sadrže azot (TNT)

### **2.3.2. Zagađenje staništa metalima i njihovim solima**

Procenjene količine metala koje se izbacuju iz rudničke jalovine iznose preko 700 miliona kilograma godišnje.<sup>29,30</sup> Kada se iskopaju velike količine geogenog supstrata, otpadni materijal vremenom otpušta preostale metale. Izluženi materijal se najčešće odbacuje na otpadne gomile odakle lako dospeva do zemljišta. Time dolazi do toksifikacije metalima biljaka, životinja i ljudi.<sup>29</sup>

Prirodne koncentracije teških metala u zemljištu zavise pre svega od vrste i hemijskih osobina materijala od kog je zemljište nastalo. Antropogenim uticajem koncentracije teških metala mogu postati znatno veće od onih koje potiču iz prirodnih izvora.<sup>15</sup>

Prosečne koncentracije nekih teških metala u Zemljinoj kori, nekim sedimentima i uopšteno u zemljištu su dati u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Elementarni sastav Zemljine kore i sedimenata.\*<sup>15,31</sup>

| Element   | Zemljina kora | Zemljin sediment | Sediment dubokih mora | Sediment plitkih voda | Sediment reka | Zemljiše |
|-----------|---------------|------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|----------|
| Gvožđe    | 4,1 %         | 4,1 %            | 6,5 %                 | 6,5 %                 | 4,8 %         | 3,2 %    |
| Titan     | 0,6 %         | 0,4 %            | 0,5 %                 | 0,5 %                 | 0,6 %         | 0,5 %    |
| Vanadijum | 160           | 105              | 120                   | 145                   | 170           | 108      |
| Hrom      | 100           | 72               | 90                    | 60                    | 100           | 84       |
| Nikl      | 80            | 52               | 250                   | 35                    | 90            | 34       |
| Cink      | 75            | 95               | 165                   | 92                    | 350           | 60       |
| Bakar     | 50            | 33               | 250                   | 56                    | 100           | 26       |
| Kobalt    | 20            | 14               | 74                    | 13                    | 20            | 12       |
| Olovo     | 14            | 19               | 80                    | 22                    | 150           | 29       |
| Kalaj     | 2,2           | 4,6              | 1,5                   | 2                     | n.n.**        | 5,8      |
| Kadmijum  | 0,11          | 0,17             | 0,42                  | n.n.                  | 1             | 0,6      |
| Živa      | 0,05          | 0,19             | 0,08                  | n.n.                  | n.n.          | 0,1      |

\*Gvožđe i titan su dati u procentima, dok su ostali elementi u  $\mu\text{g/g}$ .

\*\*n.n. Nije nađeno

Iz tabele se može zaključiti da su olovo, kadmijum, kalaj i živa najzastupljeniji metali kao antropogeni zagađivači zemljišta. Prosečna koncentracija kadmijuma u zemljištu je oko šest puta veća od koncentracije u zemljinoj kori.

Olovo je jedan od najstarijih poznatih zagađivača. Još su drenažne cevi za vodu koje potiču iz perioda starog Rima bile napravljene od olova. Neke od tih cevi na kojima su oznake rimskih imperatora su i dalje u upotrebi, iako i dalje oslobađaju olovo u zemljište kad postanu porozne.<sup>15</sup>

Upotreba olova više nije dozvoljena za izradu vodovodnih cevi zbog toksičnog efekta na čoveka. Olovo može izazvati ozbiljna oštećenja nervnog, urinarnog i reproduktivnog sistema.<sup>15</sup>

Kadmijum se uglavnom koristi u proizvodnji nikel-kadmijumskih baterija ili kao pigment i stabilizator u proizvodnji PVC-a. Kao jedan od čestih metalnih polutanata javlja se i u metalurgiji i u elektronskoj industriji. U životnu sredinu može dospeti emisijom izduvnih gasova, primenom fosfatnog đubriva u poljoprivredi, a često su deo detergenata i naftnih preradevina. Kadmijum se nalazi i u cigaretama.<sup>15</sup>

Dugotrajno izlaganje čoveka kadmijumu dovodi do renalne disfunkcije i bolesti pluća. Povezano je i sa demineralizacijom kostiju (osteomalacija i osteoporoza).<sup>15</sup>

Kalaj se koristi u proizvodnji limenki, spajanju raznih cevi, električnih spojeva, industriji keramike, elektronskoj industriji itd. U životnu sredinu ulazi u različitim oblicima, ali je najtoksičnija organska forma kalaja – metilovani kalaj. Dugotrajno izlaganje kalaju dovodi do depresije, bolesti jetre, lošeg funkcionisanja imunog sistema i hromozomalnih poremećaja. Čest je uzročnik trovanja riba.<sup>15</sup>

Živa u zemljište ulazi tamo gde ima metalurške industrije, izloženosti proizvodima metalurgije i gde se stari uređaji koji u sebi sadrže živu odbacuju u životnu sredinu. U čoveku se živa može naći u slučajevima inhalacije isparljivim živinim jedinjenjima, unošenjem žive putem hrane, ribe i morski plodovi mogu sadržati živu u većim količinama.<sup>15</sup>

Bakar je takođe metal koji je poznat još od davnina, ali se danas u životnu sredinu unosi industrijom, pre svega proizvodnje žice, električnih uređaja, proizvodnje legura mesinga, metalnog novca.<sup>15</sup>

Cink se koristi u galvanizaciji čelika, ali je i važna komponenta u mnogim legurama od kojih se jedna koristi u SAD za izradu metalnog novca, zatim za livenje u industriji automobila, proizvodnji papira za fotokopiranje, boja, industriji gume itd.<sup>15</sup>

### ***i. Transport teških metala u zemljištu***

Glavni procesi aktivnog transporta su difuzija i disperzija koji zavise od mnogih faktora, a najvažniji se odnose na kretanje i karakteristike zemljišnih rastvora i prisutnih voda. Tu spadaju intenzitet i broj kišnih dana, isparavanje, retencioni vodeni kapacitet i hidraulične osobine zemljišta kao što su konduktivnost i difuzione osobine.<sup>15</sup>

### ***ii. Monitoring zagađenja teškim metalima***

Monitoring predstavlja sistematsko posmatranje i kvantifikacija količine prisutnog zagađenja na datoj lokaciji. Monitoring se mora sprovoditi tako da omogućava detekciju prostornih i vremenskih varijacija u koncentraciji polutanata na mestu ispitivanja. Monitoring zagađenja životne sredine bi morao da pruži informacije o:<sup>15</sup>

- Prirodi zagađivača, njihovim količinama, izvorima i distribuciji.
- Efektu zagađivača.
- Rasporedu koncentracija, promenama sredine i uzrocima.
- Mogućnost i izvodljivosti remedijacije.

U slučaju monitoringa zemljišta zagađenog teškim metalima prvi korak je utvrđivanje da li je ukupni sadržaj metala u dozvoljenom rasponu ili prelazi granične vrednosti koje su date u nacionalnoj i evropskoj legislativi.<sup>32</sup>

Na osnovu matriksa većine uzoraka iz životne sredine ukupna digestija obuhvata korišćenje fluorovodonične kiseline da bi se u potpunosti oslobodili metali u tragovima koji su ugrađeni u aluminosilikate, međutim korišćenje ove kiseline zahteva stroge predostrožnosti i zato nije najpreporučljivije u rutinskim analizama.<sup>13</sup>

Kao alternativa upotrebi fluorovodonične kiseline najčešće se primenjuje luženje metala uz pomoć kiselina. U slučaju određivanja metala iz zemljišta, najčešće se koristi »carska voda« (smeša hlorovodonične i azotne kiseline u odnosu 3 : 1).<sup>33</sup> Ukoliko se želi smanjiti gubitak lako isparljivih metala i ubrzati proces digestije, onda se digestija vrši u teflonskim bombama u mikrotalasnoj peći.<sup>34</sup>

### 2.3.3. Zagađenje staništa perfluorovanim jedinjenjima<sup>35</sup>

Perfluorovana jedinjenja (PFC) su hemijske supstance koje nisu prirodnog porekla, već se koriste u hemijskoj industriji od 50-ih godina prošlog veka. Zbog jedinstvenih osobina, kao što su površinska aktivnost, sposobnost upijanja vode i ulja, otpornost na temperaturu i kiseline ova jedinjenja se koriste u industrijskim procesima kao što su zaštitni sloj u industriji tepiha, tekstila, kože, ambalaže za hranu, instalacije za telekomunikacione provodnike, ali i za komponente potrošačkih proizvoda kao što su vatrogasne pene za gašenje požara, surfaktanti (površinski aktivne supstance) u kozmetici, elektronicima i u farmaciji. Od svih PFC najčešće se koriste, a samim tim i najčešće nalaze u prirodi, perfluoro-oktan sulfonat (PFOS) i perfluorooktanoat (PFOA). Jedinstvene fizičke, hemijske i biološke osobine PFC-a koje potiču od veze između ugljenika i fluora su razlog zbog kog su ova jedinjenja otporna na hidrolizu, degradaciju kiselinama, bazama, oksidantima, reduktantima i mikrobima.<sup>36</sup> Studije su pokazale prisustvo ovih jedinjenja u svim segmentima životne sredine: vazduhu<sup>37,38</sup>, vodi<sup>39-41</sup> i sedimentima<sup>42-46</sup>. Mnoge studije su pokazale i veliko prisustvo PFC-a u životinjama i ljudima.<sup>47-52</sup>

Evropski parlament i Evropski savet su u decembru 2006. godine doneli odluku o ograničenoj upotrebi PFOS.<sup>53</sup>

## 2.4. REMEDIJACIJA ZAGAĐENIH STANIŠTA

Remedijacija je logičan nastavak koji proističe iz činjenice da se u nekom staništu koncentracije zagađivača nalaze u nedozvoljenim količinama. Cilj remedijacije je da se zagađeno stanište dovede u održivu životnu sredinu, pri čemu se koncentracija zagađivača smanjuje ispod zakonom dozvoljenog maksimuma.<sup>15</sup>

Kod zemljišta remedijacija se može izvesti na mestu gde se zagađenje nalazi (*in situ*) ili nakon odvoženja na specijalno postrojenje (*ex situ*). Remedijacija se može izvesti primenom fizičkih i hemijskih metoda ili bioremedijacijom.<sup>15</sup>



### 2.4.1. Planiranje i realizacija remedijacije zemljišta<sup>15</sup>

Uspešan remedijacioni plan se zasniva na informacijama dobijenim u toku preliminarnih istraživačkih postupaka koji moraju biti urađeni pre početka remedijacije.

Ti testovi moraju dati odgovore na sledeća pitanja:

- koji su tipovi i koja je hemijska priroda zagađivača na ispitivanoj lokaciji,
- stepen zagađenja i dimenzije zagađenog prostora,
- koji je nivo rizika,
- koje tehnike remedijacije bi bile najoptimalnije za zagađenu lokaciju,
- da li postoje finansijske restrikcije za izabrane metode remedijacije.

### 2.4.2. Tehnologije remedijacije

U zavisnosti od stepena zagađenja, nivoa rizika, finansijskih i vremenskih ograničenja tretiranje zemljišta može otpočeti na mestu zagađenja (*in situ*) ili može biti prenešeno na postrojenje posebno dizajnirano i prilagođeno za bioremedijaciju. U tu svrhu se mogu koristiti remedijacione halde (slika 2.22.), posebni reaktori ili tankovi.<sup>15</sup>



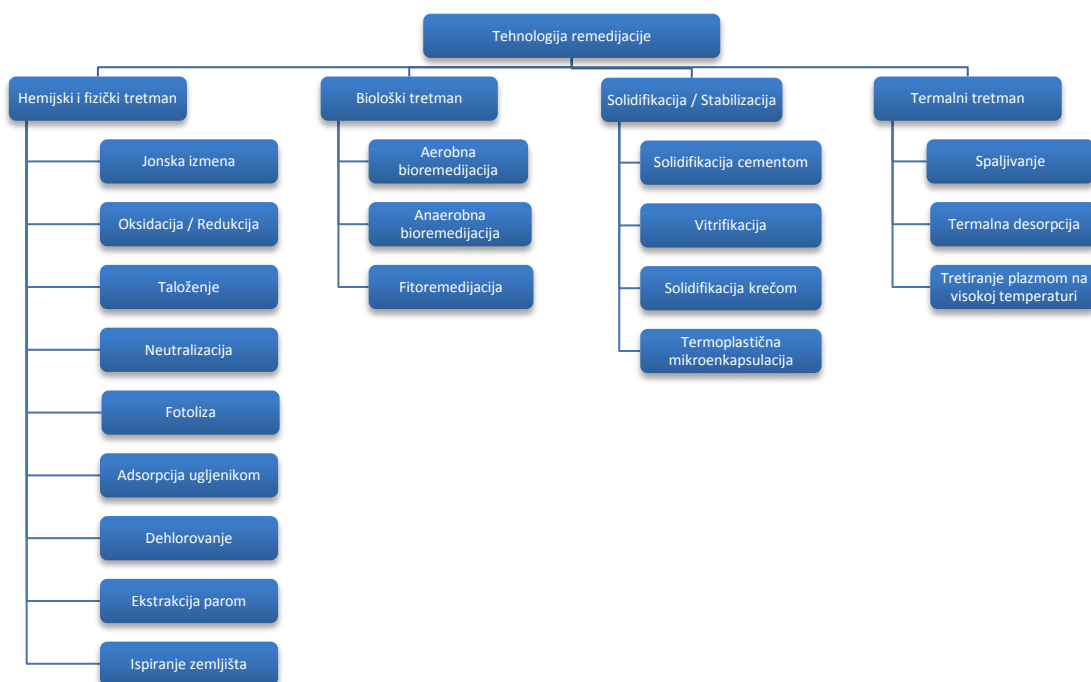
Slika 2.22. Bioremedijaciona halda

Uopšteno govoreći postoje četiri klase remedijacije:

1. Hemijske i fizičke metode
2. Biološke metode

3. Metode fiksacije (metode skladištenja i imobilizacije)
4. Metode termalne destrukcije.

Slika 2.23. pokazuje glavne tipove remedijacionih tehnologija na šematski način.



Slika 2.23. Uobičajene tehnologije remedijacije<sup>15</sup>

Neke od gore navedenih metoda mogu zahtevati specifične tehničke instalacije (tankove, ležajeve, itd.), dok su druge primenljive samo na mestu zagađenja – *in situ*.

### 2.4.3. Fizičke i hemijske tehnike remedijacije<sup>15</sup>

Jonska izmena. Komponente zemljišta sa visokim kapacitetom za jonsku izmenu mogu vezati pozitivno naelektrisane organske zagađivače i metale tako da ih učine hemijski nepokretnim i na taj način se smanjuje rizik od izlaganja ovim zagađivačima.

Oksidacija. Ova metoda je uobičajena i veoma efektivna tehnologija za zemljište kontaminirano toksičnim organskim zagađivačima i cijanidima. Oksidujućim agensima koji se koriste uključuju širok spektar supstanci od kao što su vodonik-peroksid, ozon i kalijum-permanganat.

Fotoliza. Fotolitička degradaciona tehnologija zavisi od mogućnosti degradacije organskih zagađivača sa ultraljubičastim (UV) zračenjem. Može se izvoditi korišćenjem veštačkog UV zračenja ili izlaganjem zemljišta sunčevoj svetlosti. Koristi se za degradiranje zagađivača koji su u zemljište dospeli samo do malih dubina. Proces se može izvoditi *in situ* ili u prethodno pripremljenim ležajevima. Ukoliko je zagađenje na većim dubinama zemljište mora biti iskopano i preveženo do specijalnih postrojenja.

Adsorpcija na granulisanom aktivnom ugljeniku. Ova tehnologija se zasniva na tendenciji većine organskih zagađivača da se adsorbuju na površini aktivnog uglja. Ova metoda je najpogodnija za isparljiva organska jedinjenja većih molekulskih masa, halogenovanih isparljivih organskih jedinjenja (VOC), nekih eksploziva i pesticida.

Reduktivno dehlorovanje. Veoma efikasna metoda gde se uklanja (ili zamenjuju) hlor iz polihlorovanih organskih jedinjenja. Koristi se tretiranje isparljivih hlorovanih jedinjenja propuštanjem vrućeg gasa koji sadrži kontaminirajuću supstancu kroz katalizator sa slojevima plemenitog metala, pri čemu se uništava veza sa halogenim elementom.

Ekstrakcija parom. Ovo je veoma popularna i jednostavna tehnologija za remedijaciju zemljišta kojom se uklanjaju isparljivi organski kontaminanti koji se nalaze u nezasićenom sloju zemljišta iznad podzemnih voda. Uključuje upumpavanje čistog vazduha u ovu zonu, pri čemu dolazi do odvajanja organskih para iz zemljišta. Pare se zatim uklanjaju vakuum pumpama.

Ispiranje zemljišta. Procesom ispiranja zemljišta (eng. *soil flushing*) ([http://www.clu-in.org/download/toolkit/isf\\_1117.pdf](http://www.clu-in.org/download/toolkit/isf_1117.pdf)) se ne razgrađuju zagađujuće supstance već se samo menja sredina u kome se nalaze – iz zemlje prelaze u vodu. Tehnologija je zasnovana na principu izdvajanja adsorbovanih zagađujućih supstanci iz zemlje vodom kojoj su dodati aditivi, a zatim se zagađena voda koja je ušla u podzemnu vodu, ispumpava i obrađuje. Ova tehnologija se često koristi ako je već došlo do zagađenja podzemne vode.

#### 2.4.4. Metode solidifikacije i stabilizacije

Cilj ovih metoda je da se imobilišu ili stabilišu zagađivači u zemljištu pri čemu se sprečava njihovo dalje prodiranje u životnu sredinu. Poznate su različite tehnologije koje omogućavaju ove procese, od kojih su najuspešnije:

- Solidifikacija na bazi bitumena.
- Enkapsulacija u termoplastičnim materijalima. Termoplastični materijali (kao npr. modifikovani sumporni cement) se liju i mešaju sa kontaminiranim materijalom u specijalnim tankovima i energično mešaju do homogene smeše. Nakon hlađenja i očvršćavanja mogu se bezbedno ukloniti.
- Istiskivanje polietilenom.
- Mešanje sa Pozolanskim/Portlandskim cementom. Materijali koji su zasnovani na Pozolanu (kao što su pepeo i prašina iz peći) se mešaju sa zagađenim materijalom u prisustvu vode i alkalnih rastvarova. U ovakvom okruženju mogu da se istalože teški metali. Ostatak mase se solidifikuje sa ostatkom organskih kontaminanata.
- Vitrifikacija. U ovom procesu kontaminirana zemlja se enkapsulira u staklastu masu. Ova tehnologija se može izvoditi *in situ* i *ex situ*. Vitrifikacija se izvodi ubacivanjem grafitnih elektroda u zemljište, pri čemu se one zagrevaju električnom energijom iz jakih generatora do temperatura 1600 – 1800 °C. Na ovim temperaturama zemlja se topi i stvara staklene blokove. Nakon hlađenja, organski kontaminanti se pirolizuju i redukuju do gasova, dok teški metali ostaju stabilizovani u staklenoj masi. Ovaj metod se uspešno koristi i za tretiranje zemljišta zagađenog radioaktivnim materijalom.

#### 2.4.5. Termalni tretman

Isparavanje i destrukcija kontaminanata termalnim tretmanom je veoma efikasna tehnologija. Postiže se zagrevanjem kontaminiranog materijala u pećima na temperaturama od 400 – 700 °C, nakon čega se dalje tretira na temperaturama od 800 – 1200 °C da bi se obezbedila potpuna oksidacija organskih isparljivih supstanci.

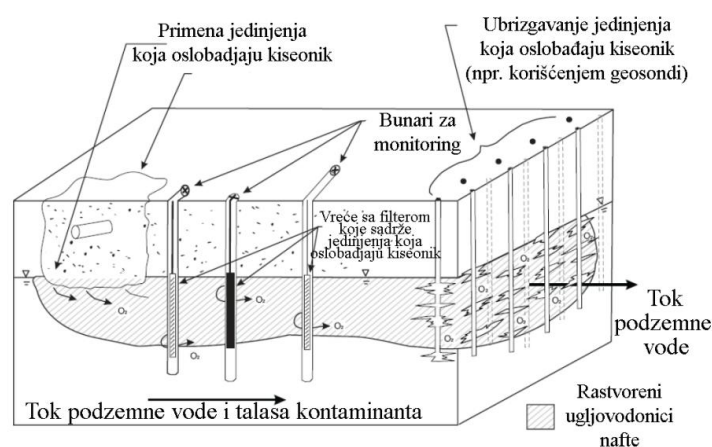
### 2.4.6. Bioremedijacija – biološki tretman

Biološki tretman kontaminiranog zemljišta je remedijaciona tehnika u kojoj se koriste mikroorganizmi koji se prirodno nalaze u zemljištu, a koji su u mogućnosti da degradiraju toksične materije. U ovakve organizme spadaju bakterije i kvasci. Neke bakterije su u mogućnosti da digestuju širok spektar organskih kontaminanata koji se na drugi način teško mogu odvojiti ili degradirati sa do sada poznatim metodama.<sup>15</sup>

Bioremedijacija je lak i efikasan metod za uklanjanje organskih kontaminanata (kao što su nafta, ulja i ostali proizvodi koji potiču iz nafte i njenih derivata) tako što ih prevodi u ugljen-dioksid i vodu. Vreme koje je neophodno da bi se završila remedijacija zavisi od toga da li se ona izvodi *in situ* ili *ex situ*. *Ex situ* tehnologije su obično brže i efikasnije od *in situ* tehnologija.<sup>15</sup>

Stimulisana bioremedijacija (<http://www.frtr.gov/matrix2/section4/4-2.html>) podrazumeva biostimulaciju (dodatak hranljivih supstanci-azota, fosfora, kiseonika) i bioaugmentaciju (dodatak mikroorganizama, pre svega bakterija, ali i kvasaca i drugih mikroba) tretirane životne sredine u cilju ubrzanja prirodnih biodegradacionih procesa pre svega ugljovodonika nafte, ali i oksigenatora nafte. Tehnologija se zasniva na obezbeđivanju dodatne količine kiseonika ispod površine zemljišta čime se stimulišu aerobni procesi razgradnje.<sup>25</sup>

Na slici 2.24. shematski je prikazan proces stimulacije prirodne bioremedijacije.



Slika 2.24. Stimulisana bioremedijacija<sup>54</sup>

Ova tehnologija je efikasna za remedijaciju zemljišta kontaminiranog ugljovodonicima nafte, VOC, pesticidima i nitrotoluenima pogotovo kada je stepen kontaminacije nizak ili kada kontaminant ističe iz podzemnog rezervoara u maloj količini. Prednosti ove metode su minimalno narušavanje topografije terena, nema generisanja otpada, jednostavna za operisanje i kontrolu i nizak je zahtev za energijom. Ipak visoke koncentracije mogu biti toksične za mikroorganizme, usled povećanja polarnosti može doći i do povećane mobilnosti kontaminanta i njegovog prelaska u podzemne vode, a pod anaerobnim uslovima kontaminant se može transformisati u još toksičnije jedinjenje.<sup>25</sup>

Ugljovodonici mogu biti razgrađeni pod aerobnim i anaerobnim uslovima. Aerobnu degradaciju prati Pasterov efekat: povećanje biomase i smanjenje utrošenog supstrata procesom fermentacije, u najširem smislu, u prisustvu kiseonika u odnosu na anaerobne uslove. Anaerobna degradacija se odvija znatno sporije od aerobne, ali je značajna u uslovima smanjene koncentracije kiseonika i veoma često omogućava razgradnju PCB.<sup>25</sup>

## **2.5. ULOGA MIKROORGANIZAMA U BIOREMEDIJACIJI STANIŠTA ZAGAĐENIH OGRANSKIM UGLJOVODONICIMA**

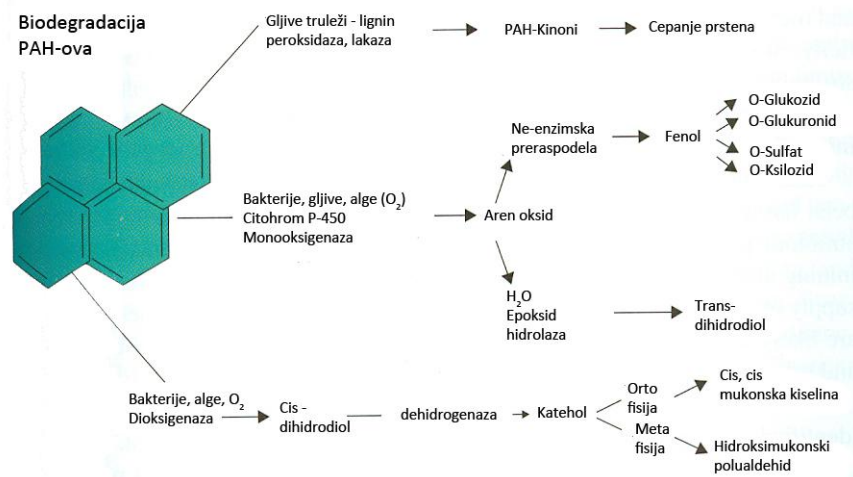
Kontinualnim razvojem industije i globalnom zavisnošću od ugljovodonika fosilnih goriva, ali i razvojem agrohemijskih proizvoda, prirodna sredina je kontaminirana čitavim spektrom organskih zagađivača (poglavlje 2.3.1.).<sup>28</sup> Zbog negativnih efekata ovih polutanata, mikroorganizmi zemljišta, koji su svojim genima uključeni u degradaciju konataminanata, pobuđuju interes kod biotehnologa koji se bave prečišćavanjem zemljišta. Fokus ovog interesovanja je na mikrobnom kapacitetu za biodegradaciju (kako na broj različitih zagađivača, tako i na stepen razgradnja pojedinih zagađivača), kao i na mogućnosti bioremedijacije zagađenog staništa.<sup>28</sup>

Neki organski zagađivači koji ulaze u zemljište su toksični za mikroorganizme i teško se razgrađuju. Razlozi mogu biti mnogi i uključuju ključne fizikohemijske osobine kao što je način na koji zagađivač ulazi u zemljišni matriks. Na primer, mnogi

poliaromatični ugljovodonici (PAH) i polihlorovani bifenili (PCB) se vezuju za čvrstu fazu zemljišta i na taj način ograničavaju pristup mikroorganizmima i enzimima. Drugi razlog nemogućnosti razgradnje nekih organskih zagađivača je i veliki broj enzimski regulisanih koraka u razgradnji zagađivača, pa je mikroorganizmima neophodan veliki broj gena koji bi regulisali enzime za takve procese. Mnogi zagađivači su sintetički i kod mikroorganizama nisu razvijeni geni koji bi kodirali enzime neophodne za katalizu degradacionih procesa.<sup>28</sup>

Razgradnja hlorovanih organskih zagađivača je dosta proučavana, kao i genski klasteri koji su važni za taj proces. Evolucija puteva razgradnje ovih zagađivača koji su genski regulisani (obično uključuju četiri do osam gena) omogućila je kompletnu razgradnju širokog spektra hlorovanih zagađivača, uključujući hlorbenzen koji se koristi u brojnim industrijskim procesima, kao i hlorfenoksi sirćetnu kiselinu koja je povezana sa nekim hormonskim herbicidima koji se koriste u poljoprivredi za suzbijanje korova. Degradacija mnogih hlorovanih organskih zagađivača je često komplikovana zbog činjenice da bakterije uklanjaju hlor iz molekula (dehalogenacijom) pod anaerobnim uslovima, tako da bi se bioremedijacija staništa zagađenog hlorovanim i nehlorovanim ugljovodonicima morala izvoditi pod aerobim i pod anaerobnim uslovima.<sup>28</sup>

Bakterije zemljišta i geni uključeni u degradaciju PAH-ova i PCB-ova takođe dosta izučavani i korišćeni u bioremedijaciji i proizvodnji bakterijskih biosenzora za detekciju ovih kompleksnih organskih zagađivača. Kod bakterija koje aerobno razlažu PAH-ove (npr. naftalen, fluoren, antracen, fenantren, piren, benzantracen, benzopiren) dolazi do oksidacije prstenova delovanjem enzima dioksigenaze pri čemu se stvara *cis*-dihidrodioli (slika 2.25.).



Slika 2.25. Shematski prikaz mikrobnog metabolizma poliaromatičnih ugljovodonika – PAH-ova<sup>28</sup>

Bakterije koje su uključene u ove oksidacione reakcije uključuju vrste *Mycobacterium* i *Pseudomonas*. Dihidrodioli se dalje transformišu do difenola, koji se zatim cepaju uz pomoć drugih dioksidgenaza. Kod mnogih bakterija ovome predhodi konverzija do salicilata i katehola. Katehol je toksičan, relativno mobilan intermedijer koji može inhibirati bakterije koje učestvuju u bioremedijaciji. Stoga se kod planiranja bioremedijacije PAH-ova ova činjenica mora uzeti u obzir.<sup>28</sup>

## 2.6. ULOGA MIKROORGANIZAMA U BIOREMEDIJACIJI STANIŠTA ZAGAĐENIH METALIMA<sup>55</sup>

Bioremedijacija staništa zagađenih toksičnim metalima je važna za obnovu staništa. Bakterije su već dugo poznate po svojoj sposobnosti da preuzimaju metale iz svog neposrednog okruženja.<sup>56</sup> Efikasnost bakterijskih ćelija u koncentrovanju metala je omogućena njihovim velikim odnosom površine i zapremine, kao i velikom gustinom naelektrisanja na površini ćelije. Površina svih bakterijskih ćelija je negativno naelektrisana zbog prisustva različitih anjona. *Bacillus subtilis*, na primer ima izoelektričnu tačku na pH 2,4. Zbog toga bakterijski ćelijski zidovi imaju jak afinitet prema metalnim katjonima. Intaktne bakterijske ćelije, bez obzira da li su žive ili mrtve, kao i njihovi proizvodi su takođe veoma efikasni u akumuliranju metala. Bakterije stoga



igraju važnu ulogu u specijaciji, sudbini i transportu metala, metaloida i radionuklida u zemljištu i drugim staništima.<sup>55</sup>

Broj bakterija u jednom gramu zemljišta može dostići vrednost od oko  $10^9$ . Ove bakterije žive u ekosistemu u kome dominiraju čvrste čestice. Od 80-90% mikroorganizama zemljišta su vezani za čvrstu površinu<sup>57</sup> elektrostatičkim interakcijama, fizičkom adhezijom i kovalentnim vezivanjem.<sup>55</sup> Stvaranjem omotača na površini čestica bakterije i njihovi ekstracelularni polisaharidi predstavljaju značajnu frakciju ukupne površine zemljišta koja je izložena vodenoj fazi.<sup>58</sup>

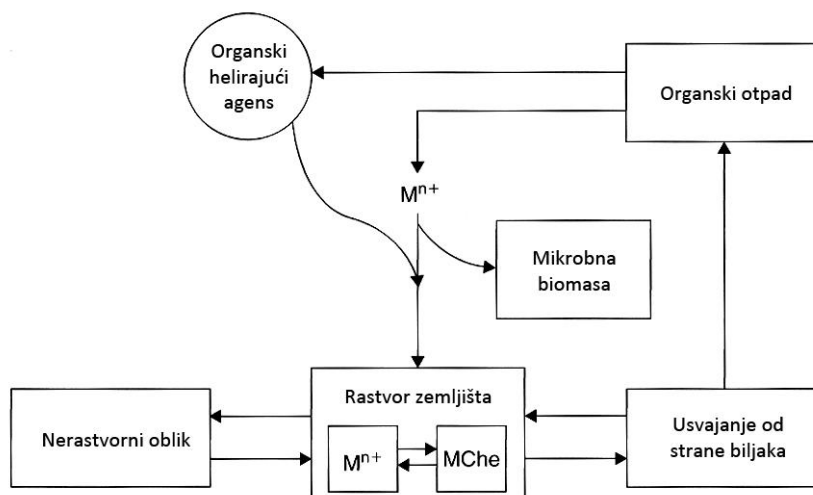
Da bi se mikroorganizmi koristili u procesu bioremedijacije neophodno ih je predhodno izolovati, kultivisati i odrediti sojeve. Mikroorganizmi zemljišta imaju veoma heterogene metaboličke puteve. Opisano je najmanje 150 različitih metaboličkih puteva i preko 900 različitih reakcija kod mikroorganizama.<sup>29</sup>

Ubacivanje žive mikrobne biomase u zemljište u cilju prečišćavanja zemljišta se naziva *bioaugmentacija*. Glavni preduslov za primenu bioaugmentacije je da su mikroorganizmi u toj biomasi otporni na metale u koncentracijama koje se nalaze na mestu bioremedijacije. Ovakvi sojevi se mogu izolovati i iz nezagađenih sredina, ali sa mnogo manjom efikasnošću.<sup>29</sup>

### **2.6.1. Mikronutrijenti i metali u tragovima kod mikroorganizama**

Mikronutrijenti su hemijski elementi koji su mikroorganizmima neophodni u malim količinama. Ovi mikronutrijenti ulaze u sastav enzima i hormona rasta. Esencijalni elementi u tragovima koji su neophodni mikroorganizmima su gvožđe, cink, mangan, bakar, bor, molibden, nikl, kobalt, hrom, selen i kalaj.

Dijagram kruženja mikronutrijenata u zemljištu je prikazan na slici 2.26.

Slika 2.26. Kruženje mikronutrijenata u zemljištu<sup>28</sup>

Koncentracije elemenata kao slobodnih jona ili rastvornih kompleksnih jedinjenja su pod uticajem abiotičkih reakcija, kao što je na primer oksidaciono stanje, kompleksiranje sa organskom materijom, stvaranje nerastvornih minerala i drugo. Mikroorganizmi su u mogućnosti da rastvore minerale i promene njihov redoks potencijal i pH. Kruženje mikronutrijenata se dešava nakon raspadanja biljnog materijala uz pomoć mikroorganizama, pri čemu metali dospevaju u zemljište.<sup>28</sup>

Najveća količina metala dospeva u zemljište antropogenim delovanjem.

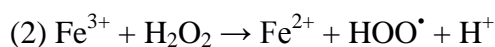
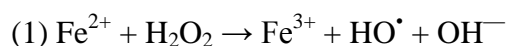
### 2.6.2. Uloga gvožđa i drugih metala u metabolizmu mikroorganizama

Gvožđe je neophodno u svim živim organizmima – prokariotskim i eukariotskim. Jedini izuzetak je mala grupa mlečno-kiselinskih bakterija.<sup>28</sup> Ono je neophodno u enzimskim procesima u toku aerobnog i anaerobnog disanja koje uključuje transfer elektrona do terminalnog akceptora. Fotosintetskim mikroorganizmima je gvožđe neophodno za građenje ferodoksina (gvožđe-sumporni protein) koji je deo fotosintetskog puta. Fero jon ( $\text{Fe}^{2+}$ ) može služiti i kao glavni izvor energije kod nekih bakterija, dok feri jon ( $\text{Fe}^{3+}$ ) služi kod drugih kao terminalni akceptor elektrona, što je važno za bakterijski metabolizam i regulaciju redoks uslova u staništu.<sup>28,59-61</sup>  $\text{Fe}^{2+}$  je bio i značajno redukciono sredstvo u evoluciji fotosinteze kao »hvatač« toksičnog kiseonika koji se

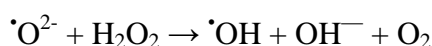
stvarao u procesima pre nego što su organizmi razvili mogućnost stvaranja superoksid-dismutaze.<sup>28</sup>

Odnos između gvožđa, huminskih kiselina (kao važne komponente zemljišta, poglavlje 2.2.5), redoks uslova i vode je važan za mikroorganizme. Huminske kiseline su redoks aktivna jedinjenja koja deluju kao donori i kao akceptori elektrona. Veliki broj mikroorganizama, uključujući Fe(III)-redukujuće i sulfat-redukujuće bakterije, metanogene i bakterije sa fermentativnim metabolizmom redukuju huminske kiseline u drugom, abiotičnom stupnju. Redukovane huminske kiseline prenose elektrone do terminalnih akceptora elektrona, kao što su slabo rastvorni Fe(III) minerali.<sup>62</sup> Povećano prisustvo Fe<sup>3+</sup> u zemljištu izaziva hidroksi radikal (<sup>•</sup>OH)-posredovanu oksidaciju i promene redoks karakteristika staništa, a to dovodi do usporavanja rasta mikroorganizama.<sup>63,64</sup> Negativni efekat većih količina Fe<sup>3+</sup> jona u zemljištu je inhibiran huminskim kiselinama koje redukuju Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup>.

Gvožđe ima ulogu prenosioca elektrona između kiseonika i bioloških molekula.<sup>62,65</sup> Reakcija oksidacije organskih biomolekula u prisustvu gvožđa zove se Fentonova reakcija. Fentonova reakcija se prvenstveno odvija u mitohondrijama, mikrozomima i peroksizomima. Hidroksil radikal HO<sup>•</sup>, jedan od najznačajnijih oksidanasa može nastati Fentonovom reakcijom:<sup>66</sup>



Fero jon (Fe<sup>2+</sup>) se oksiduje vodonik peroksidom do feri jona (Fe<sup>3+</sup>), hidroksilnog radikala (HO<sup>•</sup>) i vode. Feri jon se zatim ponovo redukuje do fero jona, superoksidnog radikala i protona uz pomoć istog vodonik peroksida. Ukupan efekat reakcije je stvaranje dve različite reaktivne vrste kiseonika. Nastali slobodni radikali se dalje koriste u drugim reakcijama. Superoksidni radikal u reakciji sa vodonik peroksidom daje hidroksil radikal, hidroksilni jon i kiseonik (Haber-Weissova reakcija):



S obzirom da mikroorganizmi ne mogu unositi nerastvorni oblik gvožđa u ćeliju i da je rastvorljivost  $\text{Fe}^{3+}$  niska, mikroorganizmi zemljišta su razvili mogućnost da proizvode  $\text{Fe}^{3+}$  - helirajuća jedinjenja koja se nazivaju *siderofore*. Siderofore pomažu odžavanje  $\text{Fe}^{3+}$  jona u rastvoru i omogućavaju bakterijama da ga unose. Nakon ulaska u ćeliju helirani  $\text{Fe}^{3+}$  jon se enzimski redukuje do  $\text{Fe}^{2+}$  i oslobađa iz siderofore koja se zatim oslobađa iz ćelije.<sup>28</sup>

Neki drugi mikronutrijenti ulaze u sastav brojnih enzima kod mikroorganizama (Tabela 2.2.).

Tabela 2.2. Uloga nekih mikronutrijenata u funkcionisanju mikroorganizama<sup>28</sup>

| Element | Uloga  |
|---------|--|
| Fe      | Prisutan u citohromima, feredoksinu i drugim gvožđe-sumpornim proteinima; kofaktor kod enzima          |
| Zn      | Prisutan u alkoholnoj-dehidrogenazi, alkalnoj-fosfatazi, adolazi, RNK- i DNK-polimerazama              |
| Mn      | Prisutan u bakterijskoj i mitohondrijskoj superoksid-dismutazi i fotosistemu II; kofaktor nekih enzima |
| Mo      | Prisutan u nitrat reduktazi, nitrogenazi, ksantin-dehidrogenazi i format-dehidrogenazi                 |
| Se      | Prisutan u glicin reduktazi i format-dehidrogenazi   |
| Co      | Prisutan u enzimima koji koriste koenzim vitamin B <sub>12</sub>                                       |
| Cu      | Prisutan u citohrom-oksidazi, nitrit-reduktazi denitrifikujućih bakterija i oksigenazama               |
| Ni      | Prisutan u ureazi, hidrogenazi i faktoru F <sub>430</sub>  |

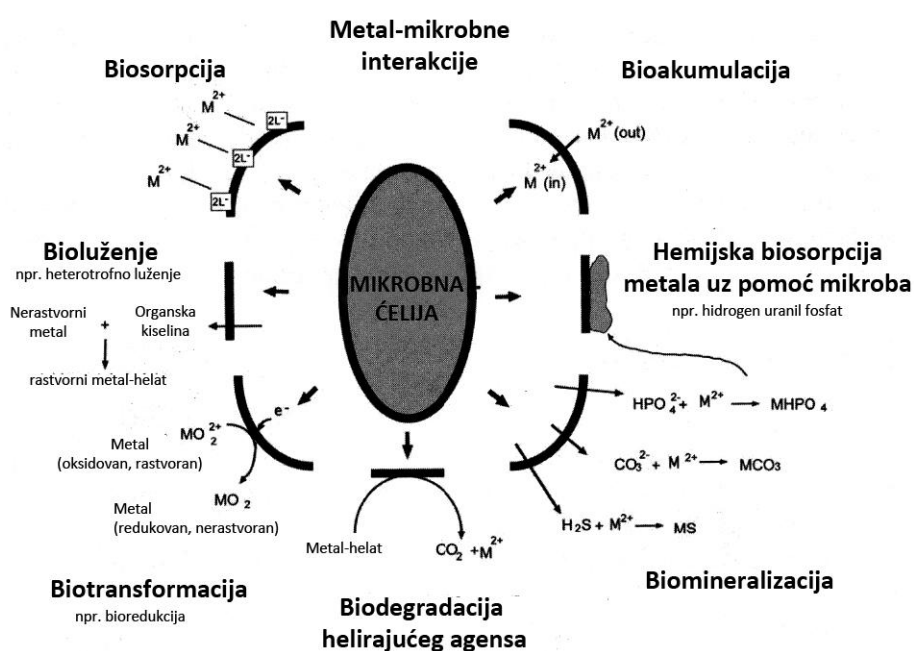
### 2.6.3. Mehanizmi biosorpcije metala od strane mikroorganizama

Biosorpcija je fizička interakcija jona metala sa specifičnim grupama na površini ćelije mikroorganizma što može pojačati ili inhibirati intracelularni transport ili uticati na procese transformacije. Biosorpcija se zasniva na pasivnim (metabolizam-nezavisnim) ili aktivnim (metabolizam-zavisnim) akumulacionim procesima, u kombinacijama koje se razlikuju kvalitativno i kvantitativno, u zavisnosti od vrste biomase, njenog porekla i izvodljivosti.

Postoji nekoliko hemijskih grupa za koje se smatra da mogu da privuku i vežu metale u biomasi: acetamido grupe hitina, polisaharidne strukture gljiva, amino i fosfatne grupe u

nukleinskim kiselinama, amido, amino, sulfhidrilne i karboksilne grupe u proteinima. Međutim, to ne znači da prisustvo određene funkcionalne grupe garantuje biosorpciju, verovatno zbog sternih i konformacionih smetnji.<sup>67</sup>

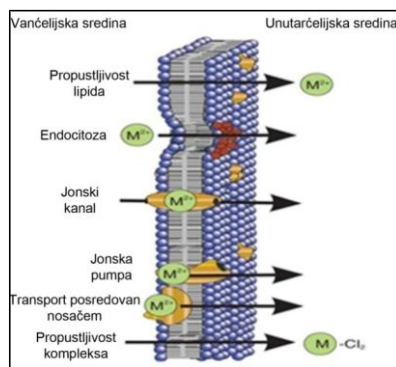
Kao što je prikazano na slici 2.27. biosorpcija obuhvata različite procese kao što su jonska izmena, heliranje, adsorpcija i difuzija kroz ćelijske zidove i membrane. Koji od ovih procesa će biti dominantan zavisi od prisutnog metala, sastava biomase i hemijskih osobina rastvora.<sup>68</sup>



Slika 2.27. Dijagram procesa uključenih u metal-mikrob interakcije<sup>55,69</sup>

Biosorpcija je brz i reverzibilan proces kojim se uklanjaju toksični metalni joni iz rastvora.

Za unos esencijalnih metala kroz ćelijsku membranu u citoplazmu mikroorganizmi generalno koriste specifične transportne puteve. Toksični metali takođe mogu da prođu kroz membranu difuzijom ili preko puteva namenjenih za druge metale. Na primer,  $Cd^{2+}$  transport se odvija preko  $Mn^{2+}$  aktivnog transportnog sistema, kod *Staphylococcus aureus*.<sup>70</sup> Na slici 2.28. su prikazani neki od mehanizama transporta metala u ćeliju.

Slika 2.28. Mehanizmi transporta metala u ćeliju<sup>70</sup>

#### 2.6.4. Rezistencija mikroorganizama na toksične metale

Veliki broj sojeva mikroorganizama su izolovani iz staništa zagađenih toksičnim metalima, pa čak i radioaktivnim metalima. Npr. Grudev je izolovao anaerobne sulfat-redukujuće bakterije iz zemljišta zagađenog sa U, Ra, Th, Cu, Cd i Pb kod rudnika u jugoistočnoj Bugarskoj.<sup>71</sup>

Iako mikroorganizmi imaju posebne sisteme preuzimanja metala, visoke koncentracije mogu biti konstitutivno transportovane u ćeliju kroz nespecifični sistem. Ova “otvorena vrata” su jedan od razloga zašto su metalni joni toksični za mikroorganizme. Kao posledica toga mikroorganizmi su bili primorani da razviju determinante otpornosti na metale. Zato joni metala ne mogu biti degradovani ili modifikovani kao toksična organska jedinjenja. Postoji više mogućih mehanizama za sistem otpornosti na metale: intra- i ekstra-ćelijska sekvestracija, aktivno isticanje pumpe, enzimska redukcija. Jedan ili više ovih mehanizama otpornosti mikroorganizmima omogućava da funkcionišu u metal- kontaminiranim sredinama.<sup>72</sup>

Rezistencija na toksične metale se kreće od nekoliko procenata do 100%, i to u sredinama sa visokim zagađenjem. Bakterijski rezistencioni mehanizam podrazumeva detoksikaciju, što takođe može dovesti do oslobađanja iz ćelije, npr. Hg(II) koji se redukuje do Hg(0).<sup>73</sup>

Bakterijski plazmidi imaju gene otporne na mnoge toksične metale i metaloide, npr. Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Sb<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>.<sup>73</sup> Geni odgovorni za otpornost na

toksične metale organizovani su u operone. Izraz otpor gena čvrsto je regulisan i indukovano prisustvom specifičnih metala u ćelijskom okruženju. Zbog ove specifičnosti, promotori i regulatorni geni iz ovih operona mogu da se koriste za izgradnju metal- specifičnih biosenzora. Pomoću posebnih metalnih bakterijskih biosenzora moguće je razlikovati biološki raspoloživu koncentraciju metala od ukupne koncentracije metala u uzorku.<sup>72</sup>

Visoke koncentracije jona teških metala unutar mikrobnih ćelija su veoma toksične. Mikroorganizmi su bili primorani da razviju metal-jon homeostatske faktore ili metal-rezistentne determinante. Ove determinante rezistencije kodiraju proteine koji imaju ulogu u mehanizmu detoksikacije i opstanku mikroorganizama u okruženjima kontaminiranim teškim metalima.<sup>74</sup>

### **3. MATERIJAL I METODE**



### 3.1. UZORKOVANJE

#### 3.1.1. Uzorkovanje zemljišta za određivanje teških metala

Uzorci su uzeti iz zemljišta sa devet reprezentativnih lokacija u južnoj industrijskoj zoni Pančeva, okolnim naseljima i gradu Pančevu (slike 3.1. i 3.2.). Na svakoj lokaciji uzorci su uzeti sa površine (0-5 cm) i sa dubina 10-15 cm, 20-25 cm, 45-50 cm i 90-100 cm. U nekim slučajevima uzorci sa dubina 45-50 i 90-100 cm nisu se mogli prikupiti zbog čvrstoće zemljišta. Uzorci su pakovani u u plastične kutije i kese i čuvani na 4°C da bi se sačuvao hemijski sastav zemljišta.<sup>75,76</sup>



Slika 3.1. Uzorkovanje zemljišta



Slika 3.2. Priprema uzoraka zemljišta

#### 3.1.2. Uzorkovanje čvrstih uzoraka<sup>25</sup>

Čvrsti uzorci uzorkovani su uzorkivačem za zemljište (eng. *soil auger*) kompanije Eijkelkamp. U zavisnosti od prodora kontaminacije u zemljište, sa mesta uzorkovanja uzorkovano je 0,5-1 kg uzorka. Zemljište pojedinačnih uzoraka je homogenizovano i uzorci za hemijska određivanja su pakovani u staklene tegle a za mikrobiološka određivanja u sterilne Petri šolje. Do laboratorije uzorci su transportovani u terenskom frižideru na temperaturi od 4°C i potom su čuvani u hladnoj komori na istoj temperaturi. Mikrobiološke analize svih uzoraka su rađene odmah po donošenju u laboratoriju, a hemijske i fizičko-hemijske u roku od 12-24 sata.

### 3.1.3. Uzorkovanje sedimenta iz kanala otpadnih voda u industrijskoj zoni Pančeva

Uzorci sedimenta su uzimani na 5 tačaka iz kanala otpadnih voda »Vojilovica« industrijske zone Pančevo (četiri uzorka su uzeta direktno iz kanala u koji se izlivaju otpadne vode, a jedan, radi poređenja, iz paralelnog navigacionog kanala) (slike 3.3. i 3.4.). Za uzorkovanje je korišćen Van Veen-ov uzorkivač. Sa svake lokacije uzeto je po 10 uzoraka (po cik-cak rasporedu u području 5 x 5 m), da bi se dobio što približniji srednji uzorak. Uzorci sa svake tačke su homogenizovani na mestu uzorkovanja u polipropilenskim sudovima koji su prethodno bili isprani metanolom. Svaki kompozitni uzorak je stoga predstavljao srednji uzorak koji je uzet sa površine od 25 m<sup>2</sup> i dubine 15 cm sedimenta.



Slika 3.3. Mesta uzorkovanja u kanalu otpadnih voda južne industrijske zone Pančevo



Slika 3.4. Ulivanje otpadnih voda u kanal

Kompozitni uzorci su spakovani u staklenim teglama u prenosnim frižiderima na 4°C i preneti do laboratorije.

## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. Temperatura

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

### 3.2.2. Potenciometrijsko određivanje pH vrednosti

pH čvrstih uzoraka je merena u suspenziji pripremljenoj od homogenizovanog uzorka i prokuvane demineralizovane vode u odnosu 1 : 2,5 posle 30 minuta mešanja na magnetnoj mešalici prema standardnoj metodi.<sup>77</sup> Merenje je izvedeno na digitalnom pH-metru (tip pH 300i) proizvodnje "WTW" (Weilhem, Germany) sa kombinovanom elektrodom istog proizvođača.

### 3.2.3. Određivanje procenta higroskopne vlage

Procenat vlage određivan je u vlagomeru (model MOC-120H) firme Shimadzu Co., Japan sa programom sušenja uzorka na 105 °C, 1.5 h. Rezultati su dati kao srednja vrednost tri ponavljanja.<sup>78</sup>

### 3.2.4. Nasipna masa

Nasipna masa (gustina) je fizičko svojstvo nasutog materijala. Ona predstavlja odnos mase i ukupne zapremine nasutog materijala izražen u g/dm<sup>3</sup>. Određivana je u menzuri od 1000 L.<sup>79</sup>

### 3.2.5. Određivanje sadržaja pepela

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

### 3.2.6. Elementarna organska mikroanaliza

Organska supstanca i njen elementarni sastav (ugljenik, vodonik, azot i sumpor) određivani su iz suve sprašene supstance elementarnom organskom mikroanalizom (EOMA) u automatskom analizatoru “VARIO-EL III CHNS-O Analyzer” proizvođača Elementar (Hanau, Germany).

### 3.2.7. Sadržaj karbonata u uzorcima zemlje

Sadržaj karbonata u čvrstim uzorcima određivanje je standardnom volumetrijskom metodom.<sup>80</sup>

### 3.2.8. Određivanje dostupnog fosfora

Dostupni fosfor u uzorku se određuje spektrofotometrijski nakon ekstrakcije iz čvrstih uzoraka po standardnoj metodi.<sup>81</sup>

### 3.2.9. Određivanje dostupnog kalijuma

Dostupni kalijum u uzorku se određuje po standardnoj metodi.<sup>82</sup>

### 3.2.10. Retencioni vodni kapacitet

Retencioni vodni kapacitet (RVK) određivan je standardnom ISO metodom.<sup>83</sup>

### 3.2.11. Gravimetrijsko određivanje ukupnih ugljovodonika nafte (TPH)<sup>84</sup>

Ukupni ugljovodonici nafte (TPH, od *eng. Total Petroleum Hydrocarbons*) su ekstrahovani po ISO 16703 (2004)<sup>85</sup> i gravimetrijski određeni po DIN EN 14354 (2004).<sup>86</sup>

### 3.2.12. Određivanje supstanci rastvornih u heksanu<sup>87</sup>

Supstance rastvorne u heksanu (HES, od eng. *Hexane Extractable Substances*) se određuju po EPA metodi.<sup>87</sup>

### 3.2.13. Izolovanje i određivanje huminskih kiselina

Huminske kiseline su izolovane po izmenjenoj standardnoj proceduri<sup>88</sup> sa rastvorom natrijum-pirofosfata, a taložene sa hlorovodoničnom kiselinom.

Za izolovanje huminskih kiselina tretirano je 40 g uzorka zemlje osušenog na vazduhu sa 200 mL rastvora NaOH/Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Huminske kiseline su ekstrahovane na ključalom vodenom kupatilu u periodu od 2h uz često mešanje, da bi se obezbedila precipitacija nerastvornih supstanci. Nakon toga, tamno-mrki rastvor je ohlađen do sobne temperature i filtriran kroz filter papir. Huminske kiseline precipitiraju iz supernatanta zakišeljavanjem 6M hlorovodoničnom kiselinom do pH 1. Nakon toga, suspenzija se ponovo filtrira, a u talogu zaostaju huminske kiseline.

### 3.2.14. Određivanje optičke gustine huminskih kiselina

Oko 0,03 g huminskih kiselina je rastvoreno u 100 ml 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>.<sup>14</sup> Pripremljeni rastvori ostavljeni su u normalnim sudovima 4 dana. Za to vreme se reakcija stabilizuje do pH 8,2 – 8,8. Određivanje optičke gustine izvedeno je na talasnim dužinama od 465 nm i 665 nm, na spektrofotometru GBC Cintra 40.

### 3.2.15. Priprema uzoraka za određivanje teških metala u zemljištu<sup>75</sup>

Uzorak se mineralizuje carskom vodom u mikrotalasnoj peći »Milestone Ethos 1«. Uzorci su stavljeni u zatvorene PTFE sudove (sudovi od poli-tetra-fluor-etilena) i tretirani sa 3 mL HNO<sub>3</sub> i 9 mL HCl za 500 mg uzorka.<sup>33</sup> Temperatura je podignuta na 165 °C u toku 10 minuta, a zatim do 175 °C za 3 minuta. Temperatura je na tom nivou održavana 10 minuta. Ohlađeni rastvor je prenet u normalni sud od 100 mL i dopunjen sa dejonizovanom vodom<sup>89</sup> i dalje tretiran kao u Poglavlju 3.3.1.

### 3.2.16. Određivanje metala u vodenom ekstraktu katalizatora

Katalizatori sa kojim je rađeno u okviru ovog rada, predstavljaju nusprodukte iz procesa desulfurizacije nafte, a tretiraju se kao otpadni materijal i čest zagađivač životne sredine. Katalizatori su u radu služili za ispitivanje mikrobicidnog dejstva metala iz katalizatora na konzorcijum mikroorganizama koji je izolovan po proceduri u Poglavlju 3.4.3. Metali na koje smo mi usmerili pažnju u ovom ispitivanju su pre svega molibden (Mo) i kobalt (Co) zbog eventualne primene ispitivanog konzorcijuma u procesima bioremedijacije u kojima pored naftnog zagađenja postoji i povećan sadržaj navedenih metala.

Vodeni ekstrakt katalizatora je dobijen prema sledećoj proceduri: 30 g samlevenog katalizatora je pomešano sa 300 mL destilovane vode. Suspenzija je ključala 30 minuta, nakon čega je profiltrirana prvo kroz kvalitativan, a zatim i kroz kvantitativan filter papir. Bistar filtrat je dopunjen do 1000 mL. Iz dobijenog rastvora su određivani Fe, As, Ni, Co, Mo po metodi opisanoj u Poglavlju 3.3.1.

### 3.2.17. Određivanje metala u katalizatoru stapanjem

Da bi se odredio sadržaj metala u katalizatoru (opisanom u Poglavlju 3.2.16.), uzorak je alkalno stopljen smešom  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1:2), a zatim lužen sa HCl. Iz dobijenog rastvora su određivani Fe, As, Ni, Co, Mo metodom opisanom u Poglavlju 3.3.1.

### 3.2.18. Određivanje perfluorovanih jedinjenja (PFC) u uzorcima sedimenta<sup>35</sup>

#### *i. Standardni rastvori i reagensi*

Standard perfluoroalkil karboksilata (PFCA) i perfluoroalkilovana jedinjenja PFAS (MPFAC-MXA) su bila od proizvođača Wellington Laboratories (Guelph, ON, Canada). Svi rastvarači i reagensi su bili HPLC čistoće.

## **ii. Ekstrakcija sedimenta**

Za ekstrakciju PFC iz sedimenta iz otpadnog kanala u industrijskoj zoni Pančeva homogenizovano je 5 grama prethodno osušenog sedimenta sa 10 mL metanola, na ultrazvučnom kupatilu. U uzorak dodati MPFAC-MXA (100 ng/mL u metanolu), koji služi kao maseno-obeleženi surogat. U struji azota je upareno do zapremine od 5 mL i dodato 100 mL Milli-Q vode i 20 µL mravlje kiseline. Uzorak je ekstrahovan u ekstraktoru za ekstrakciju iz čvrste faze (*eng. solid phase extraction* - SPE, Presep PFC II, Wako Pure Chemical Industries) koji je prethodno pripremljen sa 10 mL 0,1% amonijum/metanol, 10 mL metanola i 15 mL Milli-Q vode. Nakon punjenja analizirane supstance kertridži su ispirani sa po 10 mL Milli-Q vode. Za eluiranje ciljnih jedinjenja je korišćen 0,1% rastvor amonijum/metanol. Nakon uparavanja u struji azota do zapremine od 1 mL dodato je 10 µL  $^{13}\text{C}_8\text{PFOA}$  (100 ng/L u metanolu) kao obeleživača.

## **iii. Instrumentalna analiza**

Finalni rastvor se analizira tečnom hromatografijom (LC) u kombinaciji sa masenim spektrometrom (MS/MS) korišćenjem Xevo TQ (Waters) kuplovan sa ACQUITY UPLC (Waters). Analitička kolona koja se koristila je ACQUITY UPLC BEH (C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm, Waters). Kod LC mobilna faza kao mobilna faza je korišćen 2 mM amonijum-acetat i acetonitril. Pri protoku od 0,3 mL/min gradijent mobilne faze je povećavan sa 1 do 95% acetonitrila za 8 minuta. Na toj vrednosti je zadržan 1 minut, a zatim ponovo smanjen do 1%. Temperatura kolone je bila 40°C. Kapilarni napon je podešen na 0,5 KV. Protok gasa je bio 1000 L/h, a temperatura 500°C.

## **3.3. INSTRUMENTALNE METODE**

### **3.3.1. Određivanje metala metodom sa indukcijom spregnutom plazmom (ICP)**

Sadržaj metala je određivan Induktivno spregnutom plazma emisionom spektrometrijom (ICP/OES iCAP-6500 Duo ICP Thermo scientific, United Kingdom) koji je opremljen sa RACID86 Charge Injector Device (CID) detektorom (slika 3.5.), standardnim staklenim koncentričnim raspršivačem, kvarcnim gorionikom, i aluminijumskim

injektorom. Optički sistem očišćen je sa argonom i Echelle polihromatskim termostatom na 38°C. Uslovi rada instrumenta su optimizovani pri čemu se postiže dovoljna osetljivost i preciznost.



Slika 3.5. ICP/OES iCAP-6500 Duo ICP Thermo scientific, United Kingdom

Arsen je u plazmu uveden u obliku svog gasovitog hidrida pomoću integrisane jedinice za generisanje gasovitih hidrida (HG-ICP-OES). Za generisanje hidrida korišćeni su rastvori natrijum-borhidrida ( $\text{NaBH}_4$ , Merck, Nemačka) 0,5 % (m/v) koji je bio stabilizovan u 0,12 M NaOH i rastvoru 6 M HCl (slobodan arsen, Merck, Nemačka). Dva multielementrana plazma standardna rastvora Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure® 1000  $\mu\text{g/mL}$  i Semiquantitative Standard 1, Specpure® 10  $\text{mg/mL}$  sertifikovana od strane Alfa Aesar GmbH & Co KG, Nemačka, korišćena su za pripremu kalibracionog rastvora za ICP-OES i HG-ICP-OES merenja, respektivno. Pojedinačni standardni Molybdenum, plazma standard solution, Specpure®, Mo 1000 $\mu\text{g/mL}$ , sertifikovan od strane Alfa Aesar GmbH & Co KG, Nemačka, korišćen je za pripremu kalibracionog rastvora za ICP-OES merenja (za molibden, Mo). Svako ICP-OES merenje je rađeno tri puta.

### 3.3.2. Metoda rendgenske difrakcije

Rendgenska difrakciona analiza korišćena je za određivanje i praćenje faznog sastava uzorka. Uzorak je analiziran na rendgenskom difraktometru marke "PHILIPS", model PW-1710, sa zakrivljenim grafitnim monohromatorom i scintilacionim brojačem.



Intenziteti difraktovanog  $\text{CuK}\alpha$  rendgenskog zračenja ( $\lambda=1,54178 \text{ \AA}$ ) mereni su na sobnoj temperaturi u intervalima  $0,05^\circ 2\theta$  i vremenu od 0,5 s, a u opsegu od  $4^\circ$  do  $65^\circ 2\theta$ . Rendgenska cev je bila opterećena sa naponom od 40 kV i struji 30 mA, dok su prorezi za usmeravanje primarnog i difraktovanog snopa bili  $1^\circ$  i 0,1 mm. Dobijeni podaci položaja difrakcionih maksimuma ( $2\theta^\circ$ ), vrednosti međupljosnih rastojanja,  $d$  ( $\text{\AA}$ ), kao i odgovarajući intenziteti,  $I$ , dati su grafički. Na osnovu dobijenih vrednosti  $I$  i  $d$ , i upoređivanjem sa literaturnim podacima i JCPDS standardima, identifikovane su prisutne faze.

Orijentisani preparati ispitani su difraktometrom za prah u opsegu  $2\theta$   $3\text{--}15^\circ$  sa korakom  $0,02^\circ$  i vremenskom konstantom 0,5 s na svakom koraku.

### 3.3.3. Elektron paramagnetna spektroskopija (EPR)<sup>90,91</sup>

EPR spektrometrija je izvođena na sobnoj temperaturi korišćenjem Varian E104-A EPR spectrometer koji je radio na X-band (9.51 GHz). Amplituda modulacije je bila 2G, frekvencija 100 kHz, mikrotalasna snaga 10 mW i vreme skeniranja 4 minuta. Korišćen je softver EW (Scientific Software Inc, IL, USA).

### 3.3.4. $^1\text{H}$ NMR spektroskopija

$^1\text{H}$ -NMR spektri huminskih kiselina su snimljeni na instrumentu proizvodnje Varian model Gemini 2000, pri frekvenciji od 200 MHz za  $^1\text{H}$  jezgro. Uzorci su rastvarani u NaOD.

### 3.3.5. $^{13}\text{C}$ NMR spektroskopija

$^{13}\text{C}$ -NMR spektri huminskih kiselina snimljeni su na uređaju Varian Gemini 2000 Spectrometer (50,28 MHz)! Uzorak za NMR analizu pripremljen je rastvaranjem 50 mg huminskih kiselina u 1 mL 0,3M rastvora NaOD u  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.4. MIKROBIOLOŠKE METODE

U svim mikrobiološkim radovima poštovana su pravila rada u mikrobiološkoj hemiji, a za pripremanje podloga upotrebljavane su supstance čistoće *pro analysi*.<sup>92</sup>

#### 3.4.1. Mikrobiološke podloge

Sve podloge su pripravane suspendovanjem i/ili rastvaranjem navedenih komponenti u destilovanoj vodi i sterilisane u autoklavu na 0,10 MPa za vreme od 20 minuta ukoliko nije drugačije naglašeno.

U svim podlogama pH se podešava dodatkom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) ili NaOH (1M)

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

Ukupne hemoorganoheterotrofne mezofilne aerobne i fakultativno anaerobne bakterije su određivane na hranljivom agaru (HA). Hranljivi agar je pripreman rastvaranjem suve podloge po uputstvu proizvođača.<sup>93</sup>

Sastav podloge (g/L):

|                         |      |                |       |
|-------------------------|------|----------------|-------|
| Pepton-1 „Torlak“       | 15 g | Kalijum-fosfat | 0,3 g |
| Mesni ekstrakt „Torlak“ | 3 g  | Agar           | 18 g  |
| Natrijum-hlorid         | 5 g  | pH ≈ 7         |       |

##### *ii. Podloga za određivanje broja ukupnih anaerobnih mezofilnih hemoorganoheterotrofnih bakterija*

Ukupne anaerobne mezofilne hemoorganoheterotrofne bakterije su određivane na hranljivom agaru sa 0,5% glukoze (HAG) zasejavanjem u anaerobnim uslovima.

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

Ukupan broj kvasaca i spora plesni je određivan na sladnom agaru (SL) koji je pripreman rastvaranjem suve podloge po uputstvu proizvođača.<sup>93</sup>

Sastav podloge (g/L):

|                          |      |          |      |
|--------------------------|------|----------|------|
| Sladni ekstrakt „Torlak“ | 30 g | Agar     | 15 g |
| Pepton „Torlak“          | 5 g  | pH ≈ 5,7 |      |

### **iv. Podloga za određivanje ukupnog broja bakterija koje razgrađuju ugljovodonike<sup>94,95</sup>**

Mikroorganizmi što razlažu ugljovodonike su određivani na mineralnoj ugljovodoničnoj podlozi sa dizelom D2 (UG) kao jedinim izvorom ugljenika.

Sastav podloge (g/L):

|                         |        |                       |      |
|-------------------------|--------|-----------------------|------|
| Amonijum nitrat         | 1 g    | Agar                  | 16 g |
| Kalijum-hidrogen fosfat | 0,25 g | Demineralizovana voda | 1 L  |
| Ekstrakt zemlje         | 50 mL  | pH ≈ 6,5-7,5          |      |

Nakon sterilizacije ohlađenoj podlozi u sterilnoj zoni je dodavan dizel D2 u količini 2000 ppm tj. 2 g ili 2,35 mL.

### **v. Podloga za određivanje sulfitredukujućih klostridija**

Sulfit redukujuće klostridije se određuju na sulfitnom agaru (SA). Sulfitni agar je pripreman rastvaranjem suve podloge po uputstvu proizvođača.<sup>93</sup>

Sastav podloge (g/L):

|                            |       |          |      |
|----------------------------|-------|----------|------|
| Kazein hidrolizat „Torlak“ | 10 g  | Agar     | 15 g |
| Natrijum sulfit            | 0,5 g | pH ≈ 7,2 |      |
| Feri citrat                | 0,5 g |          |      |

**vi. Tečna podloga za razmnožavanje i rast hemoorganoheterotrofnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija**

Hemoorganoheterotrofne mezofilne aerobne i fakultativno anaerobne bakterije se razmnožavaju na hranljivom bujonu. Hranljivi bujon je pripreman rastvaranjem suve podloge po uputstvu proizvođača.<sup>93</sup>

Sastav podloge (g/L):

|                         |      |                |       |
|-------------------------|------|----------------|-------|
| Pepton-1 „Torlak“       | 15 g | Kalijum-fosfat | 0,3 g |
| Mesni ekstrakt „Torlak“ | 3 g  | pH $\approx$ 7 |       |
| Natrijum-hlorid         | 5 g  |                |       |

**vii. Podloge za umnožavanje biomase konzorcijuma zimogenih mikroorganizama<sup>25</sup>**

U ovim podlogama korišćen je komercijalni, netoksični i biodegradabilni biosurfaktant Biosolve<sup>®</sup>CLEAR kompanije The Westford Chemical Corporation (Westford, MA, SAD) kao biodisperzant za rastvaranje dodatih ugljovodnika u prvom redu mazuta. Originalni rastvor je upotrebljavan u koncentraciji 1 mL/L.

a. Startna podloga 1 (SP1)

SP1 je pripremana rastvaranjem sledećih komponenti:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Hranljivi bujon       | 1,2 g  |
| Kontaminirana zemlja  | 5 g    |
| Demineralizovana voda | 100 mL |
| pH $\approx$ 7,0      |        |

b. Startna podloga 2 (SP2)

SP2 je pripremana rastvaranjem sledećih komponenti:

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Hranljivi bujon       | 23,3 g  |
| Ekstrakt zemlje       | 100 mL  |
| Mazut                 | 20 g    |
| Demineralizovana voda | 2000 mL |
| pH $\approx$ 7,0      |         |

Nakon sterilizacije podloge u autoklavu, ohlađenoj podlozi u sterilnoj zoni je dodavan vanbilansni mazut, dizel D2 ili TPH ekstrakt (u zavisnosti od namene i specijalizacije konzorcijuma) kao dominantni izvor ugljenika. Ugljovodonični materijal je dodatno podlogu učinio selektivnom za rast samo mikroorganizama koji tolerišu ugljovodonike i uglavnom ih koriste kao jedini izvor C atoma.

c. Radna podloga (RP)

Radna podloga (RP) pripremana je rastvaranjem sledećih komponenti direktno u mobilnom bioreaktoru:

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Autolizat kvasca               | 7,5 kg |
| Ekstrakt zemlje                | 50 L   |
| KCl                            | 100 g  |
| NH <sub>4</sub> OH             | 261 mL |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 120 mL |
| Mazut / Dizel                  | 10 kg  |
| Česmenska voda                 | 900 L  |
| pH ≈ 7,0                       |        |

Podloga nije sterilisana već je selektivnost rasta mikroorganizama postignuta visokom koncentracijom naftnih ugljovodonika.



Slika 3.6. Priprema RP u mobilnom bioreaktoru

### 3.4.2. Pomoćne mikrobiološke podloge i reagensi

#### *i. Rastvor za pripremanje serijskih razblaženja*

Fiziološki rastvor koncentracije 8,0 g natrijum-hlorida na 1L demineralizovane vode u koji je dodat 0,1 mL Tween 80 je upotrebljavan je za pripremanje razblaženja.

#### *ii. Ekstrakt zemlje*

U 100 mL demineralizovane vode dodato je 100 g zemljišta sa mesta zagađenja koje je predmet mikrobiološke i hemijske analize. Nakon sterilizacije u autoklavu i hlađenja, rastvor je proceden kroz filter papir. Ekstrakt zemlje se čuva u zamrzivaču na -20°C.

### 3.4.3. Izolovanje i umnožavanje zimogenog konzorcijuma mikroorganizama iz zemljišta zagađenog mazutom

Konzorcijum mikroorganizama se izoluje iz zemljišta zagađenog mazutom obogaćivanjem u erlenmajeru od 1L sa 200 mL podloge SP1 (Poglavlje 3.4.1.vi).<sup>96</sup>

Suspenzija ovako dobijenih mikroorganizama se koristi za zasejavanje u erlenmajeru od 5L, gde se nalazi 2000 mL podloge SP2 (Poglavlje 3.4.1.vi).

Uslovi za rast mikroba bili su sledeći: temperatura 28°C, aeracija na mućkalici (120 rpm), pH 7,0 (podešeno sa 1M HCl ili NaOH), trajanje rasta 96 sati.

Mikrobna populacija je iz erlenmajera korišćena za inokulaciju bioreaktora (približno 1% zapremine) zapremine 1000 L. Korišćena je RP Poglavlje 3.4.1.vi. Uslovi rasta mikroba su bili sledeći: nesterilni uslovi, temperatura 25°C, aeracija i mešanje vazдушnom pumpom, pH 7, trajanje rasta 48 sati.

### 3.4.4. *Ex-situ* bioremedijacija zemljišta kontaminiranog mazutom<sup>84</sup>

Halda za bioremedijaciju je napravljena na vodonepropusnoj asfaltnoj površini od približno 1500 m<sup>2</sup> i sa nagibom od 1% (Slika 3.7.). Halda se sastojala od smeše u kojoj se nalazilo 270 m<sup>3</sup> zemljišta zagađenog mazutom, 60 m<sup>3</sup> piljevine (kao dodatnog izvora ugljenika i kao punioca) i 300 m<sup>3</sup> rečnog peska, koji je dodat zbog povećanja poroznosti. Da bi se osigurala homogenost halda je mešana buldožerom i na kraju poravnata traktorom. Finalne dimenzije halde bile su 75 x 20 x 0,4 m (dužina x širina x visina) i sadržala je 600 m<sup>3</sup> materijala (supstrat za bioremedijaciju). Optimalni odnos C : N : P : K (100 : 10 : 1 : 0,1) je postignut raspršivanjem rastvorenih amonijum nitrata, diamonijum fosfata i kalijum hlorida po celoj haldi (Slika 3.8.). U toku bioremedijacije halda je kvašena, okretana i mešana svakih 15 dana da bi se postigla neophodna vlažnost i aeracija. Halda je bila reinokulisana svakih 30 dana sa pripremljenim konzorcijumom mikroorganizama. Nakon mešanja halda je bila pokrivena plastičnom polietilenskom folijom da bi se izbegao direktan uticaj vremenskih uslova. Na haldu je dodat i BioSolve CLEAR u zapremini od 70 mL originalnog rastvora po kubnom metru. Na početku eksperimenta odvojen je kontrolni uzorak od 10 m<sup>3</sup> halde. Hemijski i mikrobiološki pokazatelji bioremedijacije su praćeni odmah nakon pripreme halde i na svakih 50 dana u narednih 150 dana (označeni sa S-50, S-100 i S-150).



Slika 3.7. Bioremediaciona halda



Slika 3.8. Inokulacija halde

### **3.4.5. Ispitivanje inhibitornog dejstva metala na zimogeni konzorcijum mikroorganizama**

Kao test mikroorganizmi korišćen je konzorcijum mikroorganizama dobijen kao u Poglavlju 3.4.3.

Vodeni ekstrakt katalizatora je uparavan do suva, a nakon toga je talog rastvoren u 25 mL fiziološkog rastvora. Dobijeni rastvor metala je dodavan u epruvete u kojima su se nalazili hranljivi bujon, mikroorganizmi i fiziološki rastvor, u količinama koje odgovaraju sadržaju Mo u epruvetama od 250 mg/dm<sup>3</sup>, 500 mg/dm<sup>3</sup>, 750 mg/dm<sup>3</sup>, 1500 mg/dm<sup>3</sup>, 3000 mg/dm<sup>3</sup> i 6000 mg/dm<sup>3</sup>. Za svaku ispitivanu koncentraciju je postojala i kontrola. Epruvete su ostavljene u termostatu (T=28°C) . Rezultati su čitani posle 24h i posle 48h.

### **3.4.6. Rast mikroorganizama na podlozi sa huminskim kiselinama sa i bez dodatka FeCl<sub>3</sub>**

Suspenzija mikroorganizama (koji su izolovani kao što je opisano u Poglavlju 3.4.3.) se sipa u 6 erlenmajera (od po 250 mL) u kojima se nalazi po 50 mL hranljivog bujona (Poglavlje 3.4.1.v). Sadržaj erlenmajera je bio sledeći:

- A. Kontrola
- B. Dodato je 50 µmol/L FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O
- C. Dodato je 2,5 g/L standarda huminskih kiselina (Aldrich Humic acid sodium salt – H16752)
- D. Dodato je 2,5 g/L ekstrahovanih huminskih kiselina (Poglavlje 3.2.13.)
- E. Dodato je 50 µmol/L FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O + 2,5 g/L standarda huminskih kiselina
- F. Dodato je 50 µmol/L FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O + 2,5 g/L ekstrahovanih huminskih kiselina

Nakon inkubacije preko noći formirane kolonije se broje po proceduri opisanoj u Poglavlju 3.4.7.



### 3.4.7. Određivanje broja mikroorganizama

Broj mikroorganizama je određivan metodom serijskog razblaženja.<sup>92,97</sup> Ukupne izrasle kolonije hemoorganoheterotrofnih mezofilnih aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija, kao i ukupne anaerobne mezofilne hemoorganoheterotrofne bakterije su brojane posle 48 sati. Kvasci i spore plesni su brojane posle 72 sata, dok su kolonije mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike brojane nakon 7 do 8 dana. Zasejane agarne ploče su inkubirane na temperaturi od 28°C.

### 3.4.8. Identifikacija mikroorganizama API testovima<sup>98,99</sup>

API (eng. *analytical profile index*) testovi su realizovani po uputstvu proizvođača "BioMérieux Industry", (Marcy l'Etoile, France). API trake se sastoje od 20 minituba koje sadrže dehidratisane supstrate u kojima proizvodi bakterijskog metabolizma dovode do promene boje (spontano ili dodatkom reagensa). Dobijeni rezultati predstavljaju biohemijski profil koji se analizira pomoću softvera za identifikaciju.

#### *i. API 20NE*

API 20NE sistem je standardizovana mikrometoda kombinovana od 8 konvencionalnih testova i 12 testova asimilacije za identifikaciju Gram-negativnih rodova koji ne pripadaju *Enterobacteriaceae* (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*) u periodu od 48h.

#### *ii. API Rapid 20E*

Rapid 20E je standardizovani sistem za identifikaciju *Enterobacteriaceae* za 4 sata, uglavnom oksidaza negativnih i Gram-negativnih bakterija. Neke Gram-negativne bakterije koje ne pripadaju *Enterobacteriaceae* i oksidaza su pozitivni (*Aeromonas* i *Vibrio*), su identifikovani sa Rapid 20E.

#### *iii. API Coryne*

API Coryne je standardizovan sistem za identifikaciju korinebakterija u toku 24h.

### 3.5. PRAĆENJE EFEKTA HUMINSKIH KISELINA NA RAST ZIMOGENOG KONZORCIJUMA MIKROORGANIZAMA

#### 3.5.1. Praćenje Fentonove reakcije<sup>90</sup>

Za iniciranje Fentonove reakcije korišćen je 1,2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reanal, Mađarska) i 0,3 mM FeSO<sub>4</sub> (Merck, Nemačka). Analizirani uzorci huminskih kiselina (koncentracije 0,2 mg/mL) su bili od standarda huminskih kiselina (Aldrich Humic acid sodium salt – H16752) i huminskih kiselina ekstrahovanih po proceduri u Poglavlju 3.2.13. U eksperimentima je spin trap<sup>1</sup> reagens (DEPMPO) dodavan pre dodavanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Korišćena je ultra-čista MiliQ (18 MΩ) voda.

#### 3.5.2. Praćenje antioksidativnog kapaciteta huminskih kiselina<sup>90</sup>

Za praćenje antioksidativnog kapaciteta huminskih kiselina korišćen je model Haber-Vajsove reakcije (Haber-Weiss, strana 44) gde se stvara hidroksil radikal (•OH). Sistem se sastoji od ultra čiste vode, spin trap reagensa, huminskih kiselina (0,2 mg/mL) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nakon toga se dodaje KO<sub>2</sub> (kalijum-superoksid) kao generatora O<sub>2</sub><sup>•-</sup> u anhidrovanom DMSO (dimetil sulfoksid) do finalne koncentracije 1,6 mM. Za tumačenje spektra korišćen je kompjuterski program WINEPR SimFonia (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Karlsruhe, Germany). Parametri za DEPMPO/OH adduct su: aP = 46.7; aN = 13.9; aH(1H) = 13.5.

### 3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati dobijeni eksperimentalnim putem su statistički obrađivani u programima Microcal<sup>TM</sup> Origin<sup>TM</sup>, Version 8.0, 1991-2009 Microcal Software, Inc., Microsoft Office Excel 2007 i SPSS 11,5.

---

<sup>1</sup> Spin trap je tehnika koja se koristi za detekciju i identifikaciju kratkoživećih slobodnih radikala. Uključuje dodavanje radikala nitronu (N-oksidi imina) u formiranje spin adukta (stabilni radikal na bazi nitroksida) koji se može direktno meriti EPR spektroskopijom.

Relativna inhibicija (RI) stvaranja hidroksilnog radikala ( $\bullet\text{OH}$ ) je računata po formuli: 
$$\text{RI} = \frac{[\text{pik amplitude (Fentonova reakcija)} - \text{pik amplitude (Fentonova reakcija} + \text{huminske kiseline)}]}{[\text{pik amplitude (Fentonova reakcija)}]}$$
 Svi eksperimenti su izvođeni u tri ponavljanja, a dobijeni rezultat je predstavljen kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SE). Rezultati su ispitivani jednosmernim ANOVA testom i upoređeni sa *post-hoc* Tukey's HSD *t*-test-om.

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

Velika prilagodljivost na različite uslove spoljašnje sredine i ogroman diverzitet uslovljavaju interes za mikroorganizme kao izvore novih biološki aktivnih supstanci i/ili metaboličkih putanja.

U ovom radu proučavane su karakteristike zagađenih zemljišta / sedimanta i otpadnih materijala iz prerade nafte kao izvora mikroorganizama.

Analizirani su uzorci zemljišta oko fabrika Rafinerija nafte Pančevo, HIP Petrohemija, HIP Azotara i Messer u južnoj industrijskoj zoni Pančeva – na mestima gde postoji potencijalna opasnost od zagađenja teških metala. Osim toga, analizirano je prisustvo organskih kontaminanata u sedimentu i vodi iz kanala otpadnih voda u koji se slivaju otpadne i atmosferske vode iz nekih od navedenih fabrika. Otpadne vode se iz kanala izlivaju u reku Dunav. Kanal ima dužinu od oko 2 km i širok je oko 70 m. Prosečna dubina kanala je između 1 i 2 m.

Mazut (teška frakcija mineralnog ulja) i nus proizvod koji nastaje u procesu desulfurizacije nafte i koji se tretira kao otpadni otpad su česti zagađivači životne sredine. Urađena je njihova karakterizacija i uticaj pojedinih metala iz katalizatora na rast konzorcijuma mikroorganizama.

U drugom delu rada su izolovane i okarakterisane huminske kiseline iz zagađenog zemljišta, a zatim ispitano njihovo dejstvo na rast zimogenog konzorcijuma mikroorganizama koji je korišćen u bioremedijaciji.

#### **4.1. HEMIJSKA I MIKROBIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA ZEMLJIŠTA IZ JUŽNE INDUSTRIJSKE ZONE PANČEVA**

Analizirani su uzorci zemljišta sa devet reprezentativnih lokacija u južnoj industrijskoj zoni Pančeva, okolnim naseljima i gradu Pančevu. Uzorci su označeni sa:

1. Postrojenje za elektrolizu u okviru HIP Petrohemija
2. Centar fabrike HIP Petrohemija
3. Duž puta unutar fabrike HIP Petrohemija

4. Mesto za odlaganje žive u okviru fabrike HIP Petrohemija
5. Put oko fabrike HIP Petrohemija
6. Fabrika Messer
7. Vojilovica
8. Starčevo
9. Grad Pančevo

Svi uzorci su uzimani sa površine (0-5 cm) i sa dubina 10-15, 20-25, 40-50 i 90-100 cm. U nekim slučajevima uzorak se nije mogao uzeti sa veće dubine zbog tvrdog zemljišta. U radu su navedne kao rezultat srednje vrednosti.

#### 4.1.1. Određivanje osnovnih hemijskih pokazatelja

U tabeli 4.1. date su vrednosti određivanja suve supstance i pepela na 800 °C, a u tabeli 4.2. vrednosti određivanja elementarne organske mikroanalize.

Tabela 4.1. Sadržaj vlage i pepela na 800 °C (u %).

| Uzorak | Vlaga (105 °C) | Pepeo (800 °C)* |
|--------|----------------|-----------------|
| 1      | 2,37           | 93,12           |
| 2      | 12,96          | 94,41           |
| 3      | 22,38          | 89,01           |
| 4      | 6,92           | 92,90           |
| 5      | 7,65           | 90,87           |
| 6      | 23,39          | 87,34           |
| 7      | 21,00          | 85,48           |
| 8      | 15,22          | 87,12           |
| 9      | 20,77          | 87,97           |

\*Pepeo je izražen u odnosu na suhu supstancu

Tabela 4.2. Sadržaj N, C, H i O (u %, izraženo na suhu supstancu)

| Uzorak | N    | C    | H    | S    |
|--------|------|------|------|------|
| 1      | /    | 1,70 | 0,16 | /    |
| 2      | /    | 2,10 | 0,27 | 0,06 |
| 3      | 0,18 | 2,59 | 0,76 | 0,05 |
| 4      | 0,04 | 1,82 | 0,22 | /    |
| 5      | 0,09 | 2,26 | 0,32 | /    |
| 6      | 0,21 | 3,12 | 0,79 | 0,03 |
| 7      | 0,27 | 3,86 | 0,91 | 0,04 |
| 8      | 0,12 | 2,65 | 0,54 | /    |
| 9      | 0,25 | 3,66 | 0,70 | 0,05 |

Iz tabela 4.1. i 4.2. se uočava da uzorci 6-9 imaju viši sadržaj organske supstance, a u uzorcima 6, 7 i 9 je i sadržaj azota viši od 0,2%. Prosečni sadržaj azota u zemljištu se kreće od 0,1 – 0,2%. Zemljište zagađeno organskim kontaminantima ima visok C/N odnos.

#### 4.1.2. Sadržaj metala u uzorcima zemljišta<sup>75</sup>

Uzorci sa svake lokacije su analizirani na sledeće metale: Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn, V i Hg. U tabeli 4.3. su navedene srednje vrednosti rezultata za uzorke sa svih dubina na ispitivanim lokacijama.<sup>75</sup>

Tabela 4.3. Sadržaj metala (u mg/kg suve supstance)\*

| Lokacija | Ba  | Cd   | Co   | Cr   | Cu   | Mn  | Ni   | Pb   | Zn    | V    | Hg    |
|----------|-----|------|------|------|------|-----|------|------|-------|------|-------|
| 1        | 57  | 0,18 | 5,8  | 41,2 | 12,0 | 323 | 39,2 | 17,5 | 91,3  | 21,7 | 93,9  |
| 2        | 543 | 0,52 | 2,8  | 47,7 | 795  | 184 | 18,8 | 280  | 957,4 | 14,8 | 279,6 |
| 3        | 238 | 0,06 | 11,8 | 63,8 | 22,2 | 737 | 47,8 | 30,5 | 80,3  | 79,8 | 4,2   |
| 4        | 70  | 0,19 | 6,3  | 40,2 | 13,3 | 356 | 37,2 | 16,7 | 74,1  | 24,7 | 19,0  |
| 5        | 126 | 0,06 | 7,1  | 34,9 | 11,0 | 427 | 26,8 | 17,2 | 56,5  | 42,8 | < 2,0 |
| 6        | 271 | 0,08 | 11,8 | 64,8 | 41,7 | 762 | 49,9 | 36,9 | 108,7 | 83,0 | 2,6   |
| 7        | 274 | 0,07 | 12,5 | 71,6 | 31,6 | 753 | 62,9 | 42,5 | 149,3 | 82,3 | < 2,0 |
| 8        | 194 | 0,06 | 10,6 | 48,2 | 19,5 | 585 | 35,2 | 26,7 | 143   | 62,7 | 2,1   |
| 9        | 231 | 0,04 | 10,1 | 55,6 | 28,6 | 685 | 39,4 | 38,8 | 99,7  | 72,3 | < 2,0 |

\* Merna nesigurnost svih merenja bila je najviše 3%, dok je proširena merna nesigurnost sa faktorom pouzdanosti 2 bila najviše 6%.

Radi poređenja, u tabeli 4.4. date su vrednosti maksimalnih dozvoljenih količina u Republici Srbiji<sup>100</sup> i Evropskoj Uniji (EU).<sup>101</sup>

Tabela 4.4. Granične vrednosti za metale u zemljištu (u mg/kg suve supstance)<sup>75,100,101</sup>

| <b>Metal</b> | <b>Prirodne koncentracije u zemljištu</b> | <b>R. Srbija</b> | <b>EU</b> |
|--------------|---|------------------|-----------|
| <b>Ba</b>    | 86 – 357                                  | /                | /         |
| <b>Cd</b>    | 0,06 – 0,08                               | 2                | 1 – 3     |
| <b>Co</b>    | 1,84 – 37,71                              | /                | /         |
| <b>Cr</b>    | 4,5 – 561,1                               | 100              | /         |
| <b>Cu</b>    | 17,2 – 35,7                               | 100              | 50 – 140  |
| <b>Mn</b>    | 126,4 – 2022,0                            | /                | /         |
| <b>Ni</b>    | 6,2 – 245,8                               | 50               | 30 – 75   |
| <b>Pb</b>    | 15,6 – 44,4                               | 100              | 50 – 300  |
| <b>Zn</b>    | 70,3 – 171,7                              | 300              | 150 – 300 |
| <b>V</b>     | 23,0 – 95,9                               | /                | /         |
| <b>Hg</b>    | 0,06 – 0,91                               | 2                | 1 – 1,5   |

Iz tabela 4.3. i 4.4 se može uočiti da su vrednosti za Ba, Cd, Cu, Pb i Zn na lokacijama 2, 4 i 6 – Ba(2), Cd(2,4), Cu(2,6), Pb (2) i Zn (2) veće u odnosu na prirodne koncentracije, dok je sadržaj žive veći u svim ispitivanim uzorcima što ukazuje na prisustvo kontaminacije. Vrednosti za ostale metale (Ca, Co, Cr, Mn, Ni i V) su unutar prirodnih vrednosti.

Poređenjem rezultata za sadržaj metala ekstrahovanih carskom vodom (Poglavlje 3.2.15.) sa nacionalnim i pravilnikom EU (Tabela 4.4.) može se uočiti da je u nekim uzorcima zemljišta nivo metala (Cu, Pb, Zn i Ni) iznad maksimalno dozvoljenih koncentracija. Zemljište sa oznakom 2 ima veći sadržaj Ba, Cu, Pb, Zn i Hg nego što je to propisano u našoj zemlji. Zemljište sa oznakom 7 ima veći sadržaj nikla nego što je propisano. Ova zagađenja potiču od stalne idustrijske aktivnosti (petrohemijska industrija, rafinerija, zagađenje koje potiče od saobraćaja).

#### 4.1.3. Mikrobiologija zemljišta

Rezultati mikrobiološke analize ispitivanih uzoraka zemljišta su prikazani u tabeli 4.5.



Tabela 4.5. Mikrobiološka analiza zemljišta (cfu/g)

| Uzorak | HA              | SL              | HAG             | SA              |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1      | $1 \times 10^6$ | $2 \times 10^3$ | $9 \times 10^5$ | $2 \times 10^2$ |
| 2      | $1 \times 10^6$ | $1 \times 10^4$ | $2 \times 10^5$ | $2 \times 10^3$ |
| 3      | $5 \times 10^6$ | $4 \times 10^4$ | $2 \times 10^6$ | $2 \times 10^5$ |
| 4      | $2 \times 10^6$ | $1 \times 10^4$ | $8 \times 10^5$ | $5 \times 10^4$ |
| 5      | $1 \times 10^6$ | $1 \times 10^4$ | $1 \times 10^6$ | $1 \times 10^3$ |
| 6      | $5 \times 10^6$ | $3 \times 10^4$ | $1 \times 10^6$ | $2 \times 10^3$ |
| 7      | $1 \times 10^6$ | $3 \times 10^4$ | $8 \times 10^5$ | $2 \times 10^3$ |
| 8      | $2 \times 10^6$ | $6 \times 10^3$ | $5 \times 10^5$ | $2 \times 10^2$ |
| 9      | $2 \times 10^6$ | $2 \times 10^4$ | $6 \times 10^5$ | $3 \times 10^3$ |

Dobijeni rezultati pokazuju da i pored prisustva povišene koncentracije nekih teških metala u uzorcima 2 i 7 nema razlike u opštim mikrobiološkim pokazateljima.

## **4.2. HEMIJSKA I MIKROBIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA SEDIMENATA I VODE IZ KANALA OTPADNIH VODA IZ JUŽNE INDUSTRIJSKE ZONE PANČEVA**

Kanal otpadnih voda je veštački kanal koji nema svoj prirodni tok. Dužina mu je oko 2 km, a prosečna širina oko 70 m. U njega se izlivaju otpadne i atmosferske vode iz nekoliko fabrika, a voda se dalje uliva u reku Dunav.

### **4.2.1. Osnovne hemijske i mikrobiološke karakteristike sedimentata i vode**

Analizom uzoraka sedimenta iz kanala otpadnih voda južne industrijske zone Pančevo utvđene su sledeće karakteristike: neutralni pH, relativno visoka koncentracija organskog ugljenika i visoka koncentracija neogranskog ugljenika (Tabela 4.6.)

Tabela 4.6. Osnovne hemijske i mikrobiološke osobine uzoraka sedimenata<sup>35</sup>

| Parametar           | Jedinica | Mesto uzorkovanja u kanalu otpadnih voda |                       |                       |                       |                       |
|---------------------|----------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                     |          | P-1                                      | P-2                   | P-3                   | P-4                   | P-5                   |
| pH                  |          | 7,4                                      | 7,3                   | 7,3                   | 7,4                   | 7,6                   |
| Ukupni ugljenik     | %        | 4,3 ± 0,1*                               | 3,4 ± 0,1             | 12,7 ± 0,1            | 12,5 ± 0,1            | 12,9 ± 0,1            |
| Organski ugljenik   |          | 2,1 ± 0,1                                | 1,8 ± 0,1             | 1,9 ± 0,1             | 2,1 ± 0,1             | 5,4 ± 0,1             |
| Neorganski ugljenik |          | 2,2 ± 0,2                                | 1,6 ± 0,1             | 10,8 ± 1,6            | 10,4 ± 1,4            | 7,5 ± 0,3             |
| Ukupni azot         |          | 0,28±0,04                                | 0,24±0,02             | 0,13±0,01             | 0,24±0,01             | 0,15±0,02             |
| Ukupni sumpor       |          | 0,19±0,02                                | 0,16±0,01             | 0,09±0,02             | 0,32±0,01             | 0,48±0,03             |
| TPH                 | g/kg     | 1,6 ± 0,2                                | 0,2 ± 0,1             | 4,1 ± 0,3             | 4,9 ± 0,6             | 35,6 ± 0,9            |
| HA <sup>1</sup>     | CFU/g    | 1,3 x 10 <sup>6</sup>                    | 1,4 x 10 <sup>6</sup> | 1,4 x 10 <sup>6</sup> | 1,9 x 10 <sup>6</sup> | 1,3 x 10 <sup>6</sup> |
| UAH <sup>2</sup>    |          | 1,3 x 10 <sup>6</sup>                    | 4,0 x 10 <sup>6</sup> | 2,0 x 10 <sup>6</sup> | 8,0 x 10 <sup>6</sup> | 1,7 x 10 <sup>6</sup> |
| Kvasci i plesni     |          | 2,1 x 10 <sup>5</sup>                    | 1,4 x 10 <sup>5</sup> | 4,6 x 10 <sup>4</sup> | 7,0 x 10 <sup>4</sup> | 4,0 x 10 <sup>4</sup> |
| HD <sup>3</sup>     |          | 4,0 x 10 <sup>5</sup>                    | 1,2 x 10 <sup>5</sup> | 3,0 x 10 <sup>5</sup> | 2,0 x 10 <sup>5</sup> | 1,2 x 10 <sup>5</sup> |

\*Standardna devijacija od pet merenja

<sup>1</sup>Ukupni hemoorganoheterotrofi

<sup>2</sup>Ukupni anaerobni hemoorganoheterotrofi

<sup>3</sup>Mikroorganizmi koji kao izvor ugljenika koriste ugljovodonike iz nafte

Atmosferske vode koje ispiraju rafinerijsko i petrohemijsko zemljište su uzrokovale visok sadržaj TPH u uzorku P-5. Visoka koncentracija karbonata je određena u uzorcima P-3, P-4 i P-5.

Prisustvo velikog broja mikroorganizama u opsegu 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cfu/g, što pokazuje da se intenzivni aerobni i anaerobni procesi odvijaju u sedimentu otpadnih voda južne industrijske zone u Pančevu i da je ovaj materijal dobar matriks za proučavanje mogućih biotičkih transformacija i organskih kontaminanata.

U Tabelama 4.7. i 4.8. navedeni su osnovni hemijski i fizičko-hemijski parametri uzorka vode iz kanala otpadnih voda južne industrijske zone Pančevo.

Tabela 4.7. Fizičko-hemijski parametri uzorka vode iz kanala otpadnih voda južne industrijske zone Pančevo<sup>106</sup>

|  |       |
|--|-------|
| <sup>1</sup> Ukupna tvrdoća (dH)                 | 17,6  |
| <sup>1</sup> Elektroprovodljivost (μS/cm)        | 650,0 |
| <sup>1</sup> Mineralizacija (mg/L)               | 730,0 |
| <sup>1</sup> Ukupna ulja i masti (mg/L)          | 3,29  |
| <sup>1</sup> Totalni organski ugljenik (mg/L)    | 6,6   |
| <sup>1</sup> Hemijska potrošnja kiseonika (mg/L) | 820   |
| <sup>1</sup> Biološka potrošnja kiseonika (mg/L) | 667   |
| <sup>1</sup> pH                                  | 8,10  |
| <sup>2</sup> Ukupni ugljenik (%)                 | 2,61  |
| <sup>2</sup> Ukupni vodonik (%)                  | 0,88  |
| <sup>2</sup> Ukupni azot (%)                     | 0,53  |
| <sup>2</sup> Ukupni sumpor (%)                   | 16,08 |
| <sup>1</sup> Suva supstanca na 105 °C (mg/L)     | 725,0 |
| <sup>2</sup> Pepeo na 800 °C (%)                 | 86,40 |

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

<sup>2</sup>Rezultati se odnose na suhu supstancu određenu na 105°C.

Tabela 4.8. Hemijski parametri uzorka vode iz kanala otpadnih voda južne industrijske zone Pančevo<sup>106</sup>

| Katjoni   | mg/L  | Anjoni   | mg/L   |
|---|-------|--|--------|
| <sup>1</sup> Kalcijum (Ca <sup>2+</sup> )             | 88,2  | <sup>1</sup> Karbonati (CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )      | <0,1   |
| <sup>1</sup> Magnezijum (Mg <sup>2+</sup> )           | 22,4  | <sup>1</sup> Hidrokarbonati (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) | 125,0  |
| <sup>1</sup> Natrijum (Na <sup>+</sup> )              | 73,1  | <sup>1</sup> Hloridi (Cl <sup>-</sup> )                      | 49,7   |
| <sup>1</sup> Kalijum (K <sup>+</sup> )                | 5,3   | <sup>1</sup> Sulfati (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )        | 310,0  |
| <sup>1</sup> Gvožđe (Fe)                              | 0,32  | <sup>1</sup> Nitrati (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )         | 21,0   |
| <sup>1</sup> Mangan (Mn)                              | 0,05  | <sup>1</sup> Nitriti (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )         | <0,005 |
| <sup>1</sup> Amonijak (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) | <0,05 | <sup>1</sup> Fosfor (P)                                      | 0,040  |

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

Na osnovu rezultata fizičko-hemijske i hemijske analize vode, kanala otpadnih voda južne industrijske zone Pančevo, može se zaključiti da postojeće postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda nije dovoljno efikasno. Na zagađenje vode ukazuje i povećana koncentracija ukupnih masti i ulja i visok procenat sumpora. Katjoni, anjoni, esencijalni mikroelementi i dobra

rastvorljivost kiseonika ukazuju da ove vode mogu biti pogodne za hemoorganoheterotrofne mikroorganizme. Kiseonik je ograničavajući faktor s obzirom da je njegova koncentracija presudna za rast aerobnih mikroorganizama. Odnos BPK/HPK, koji je 0,82, ukazuje na mogućnost biološkog prečišćavanja ove otpadne vode. Visok sadržaj ukupnih rastvorenih supstanci doprinosi visokoj vrednosti za pepeo suve supstance.<sup>106</sup>

#### 4.2.2. Određivanje perfluorovanih jedinjenja u sedimentima kanala otpadnih voda iz južne industrijske zone pančeva<sup>35</sup>

Prisustvo PFC je potvrđeno u svim analiziranim uzorcima sedimenta, a perfluoro oktansulfonska kiselina (PFOS) je najzastupljenija (Tabela 4.9.).

Tabela 4.9. Sadržaj detektovanih perfluorovanih jedinjenja (PFC) u uzorcima sedimenata (u ng/g suve supstance)<sup>35</sup>

| Vrsta PFC |       | Uzorak |        |        |       |       |
|-----------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|
|           |       | P-1    | P-2    | P-3    | P-4   | P-5   |
| PFCA      | PFHxA | < g.k. | < g.k. | < g.k. | 0,170 | 0,066 |
|           | PFOA  | 0,068  | 0,080  | < g.k. | 0,130 | 0,076 |
| PFSA      | PFHxS | 0,23   | n.d.   | 0,17   | n.d.  | n.d.  |
|           | PFOS  | 0,29   | 2,10   | 5,30   | 5,70  | 0,42  |
|           | PFDS  | n.d.   | n.d.   | n.d.   | 0,29  | n.d.  |
| ΣPFC      |       | 0,588  | 2,180  | 5,470  | 6,290 | 0,562 |

<sup>a</sup>Značenje skraćenica: PFCA – perfluoro karbonske kiseline, PFHxA – perfluoro heksanska kiselina, PFOA – perfluoro oktanska kiselina, PFSA – perfluoro sulfonske kiseline, PFHxS – perfluoro heksansulfonska kiselina, PFOS – perfluoro oktansulfonska kiselina, PFDS – perfluoro dekansulfonska kiselina, n.d. – nije detektovano, g.k. – granica kvantifikacije

U sedimentu P-1, koji je uzet iz navigacionog kanala gde se ne otpušta industrijski otpad takođe je utvrđeno prisustvo PFOS-a (~49%), PFHxS-a (~39%) i PFOA (~12%). S obzirom da se taj kanal koristi kao izvor tehničke vode za industriju, a tu je smeštena i luka za brodove koji prevoze sirovine i gotove proizvode u/iz industrijsku zonu razumljivo je pretpostaviti da PFC-ovi potiču od brodova.

U sedimentu koji je uzet sa tačke P-2 (a koja se nalazi na ušću kanala otpadnih voda u reku Dunav i nizvodno od svih industrijskih uticaja) nađen je relativno visok nivo PFC-a koji obuhvataju PFOS (96%) i PFOA (4%).

Sediment P-3 je uzet sa lokacije gde se uliva voda iz HIP – Azotare. Ova fabrika nema nijedno postrojenje za preradu otpadnih i atmosferskih voda, već se sve vode sakupljaju prvo u zbirnom kanalu, a odatle izlivaju u kanal otpadnih voda.<sup>107</sup> U ovom sedimentu je prisutan PFHxS (3%), a najprisutniji je PFOS (97%).

Sediment koji je označen sa P-4 je uzet sa mesta na kome se nalazi odvodna cev iz HIP – Petrohemije je najzagađeniji ne samo u odnosu na koncentraciju već i na raznolikost PFC-a. Najviše ima PFOS-a (~90%), a zatim i PFDS (~5%), PFHxA (~3%) i PFOA (~2%).

Na mestu uzorkovanja označenom sa P-5, gde se ulivaju sakupljene atmosferske vode iz rafinerije, detektovano je prisustvo PFOS (~75%), PFOA (~13%) i PFHxA (~12%). Koncentracija PFC-a je bila najmanja u ovom sedimentu.

### **4.3. HEMIJSKA I MIKROBIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA ZEMLJIŠTA KONTAMINIRANOG MAZUTOM<sup>84</sup>**

Osnovne hemijske, fizičko hemijske i mikrobiološke osobine zemljišta kontaminiranog mazutom koje potiče iz rafinerije Pančevo i supstrata za bioremedijaciju, tj. bioremedijacione halde (Poglavlje 3.4.4.) su prikazane u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Osobine zemljišta kontaminiranog naftom i supstrata za bioremedijaciju<sup>84</sup>

| Karakteristika                          | Jedinica          | Sadržaj                        |                             |
|---|-------------------|--------------------------------|-----------------------------|
|   |                   | Zemljište kontaminirano naftom | Supstrat za bioremedijaciju |
| Nasipna masa                            | kg/m <sup>3</sup> | 1538 ± 100*                    | 1612 ± 100*                 |
| Vlaga                                   | %                 | 17,8 ± 0,3                     | 13,9 ± 0,6                  |
| Retencioni vodeni kapacitet             |                   | 18,3 ± 1,6                     | 26,1 ± 1,4                  |
| pH                                      |                   | 7,3 – 7,5                      | 7,4 – 7,6                   |
| Gubitak žarenjem                        | %                 | 8,5 ± 1,2                      | 9,7 ± 1,1                   |
| TPH                                     | g/kg              | 12,4 ± 0,5                     | 5,2 ± 0,2                   |
| Organski ugljenik                       | %                 | 1,79 ± 0,06                    | 2,44 ± 0,08                 |
| Neorganski ugljenik**                   |                   | 1,45 ± 0,05                    | 0,67 ± 0,06                 |
| Ukupni azot                             |                   | 0,16 ± 0,03                    | 0,12 ± 0,01                 |
| Dostupni fosfor                         | mg/kg             | 47 ± 3                         | 25 ± 3                      |
| Dostupni kalijum                        |                   | 18 ± 3                         | 10 ± 2                      |
| Ukupni hemoorganoheterotrofi            | CFU/g             | 1,2 x 10 <sup>6</sup>          | 9,7 x 10 <sup>5</sup>       |
| Bakterije koje razgrađuju ugljovodonike |                   | 2,7 x 10 <sup>5</sup>          | 5,6 x 10 <sup>4</sup>       |

\*Greška određivanja. Kod ostalih vrednosti: ± standardna devijacija za pet merenja

\*\*Preračunato na osnovu izmerenih karbonata

Koncentracije teških metala u svim uzorcima su bile ispod referentnih vrednosti.<sup>102</sup>

Mikroorganizmi koji razgrađuju ugljovodonike su prisutni u zemljištu kontaminiranom naftom sa oko 20% u odnosu na ukupni broj bakterija što ukazuje na prisustvo intezivnih bioremedijacionih procesa i na veliki bioremedijacioni potencijal. U supstratu za bioremedijaciju ima svega oko 6% ovih bakterija što je posledica razblaženja.

Da bi se pratilo da li je analiza kompozitnog uzorka dovoljno reprezentativna i adekvatno prikazuje stanje halde glavni parametar bioremedijacije – TPH je bio analiziran u kompozitnom uzorku u 5 nezavisnih ponavljanja, kao i u svih 30 individualnih uzoraka od kojih je kompozitni uzorak napravljen. Rezultati ukazuju da je analiza kompozitnog uzorka adekvatan primer za ovo izučavanje.<sup>84</sup>

Promene koje su se dešavale u toku procesa bioremedijacije mogu se videti u tabeli 4.11.

Tabela 4.11. Promene osnovnih parametara u toku procesa bioremedijacije<sup>84</sup>

| Parametar                                  | Jedinica | S-0                   | S-50                  | S-100                 | S-150                 |
|--|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Vlaga                                      | %        | 15,4 ± 0,5            | 13,0 ± 0,7            | 14,5 ± 0,2            | 13,4 ± 1,5            |
| Retencioni vodeni kapacitet                |          | 26,4 ± 1,7            | 29,1 ± 1,8            | 30,2 ± 1,1            | 32,1 ± 1,5            |
| pH   |          | 7,3 – 7,5             | 7,3 – 7,5             | 7,2 – 7,6             | 7,1 – 7,3             |
| Gubitak žarenjem                           | %        | 9,9 ± 1,1             | 6,9 ± 1,6             | 6,7 ± 0,2             | 6,1 ± 0,7             |
| Organski ugljenik                          |          | 2,46 ± 0,04           | 1,87 ± 0,08           | 1,19 ± 0,06           | 1,08 ± 0,05           |
| Neorganski ugljenik                        |          | 0,65 ± 0,03           | 0,66 ± 0,04           | 0,60 ± 0,03           | 0,56 ± 0,03           |
| Ukupni azot                                |          | 0,25 ± 0,03           | 0,23 ± 0,04           | 0,22 ± 0,02           | 0,25 ± 0,01           |
| Dostupni fosfor                            | mg / kg  | 241 ± 5               | 239 ± 4               | 250 ± 3               | 245 ± 2               |
| Dostupni kalijum                           |          | 24 ± 3                | 25 ± 4                | 21 ± 2                | 24 ± 3                |
| TPH  | g / kg   | 5,2                   | 2,1                   | 1,3                   | 0,3                   |
| Biodegradirani TPH                         | %        | /                     | 60                    | 75                    | 94                    |
| <b>Supstrat za bioremedijaciju (halda)</b> |          |                       |                       |                       |                       |
| Ukupni hemoorganoheterotrofi               | CFU / g  | 2,0 x 10 <sup>6</sup> | 2,2 x 10 <sup>6</sup> | 1,3 x 10 <sup>7</sup> | 8,0 x 10 <sup>6</sup> |
| Bakterije koje razgrađuju ugljovodonike    |          | 7,2 x 10 <sup>4</sup> | 1,5 x 10 <sup>6</sup> | 9,9 x 10 <sup>6</sup> | 2,0 x 10 <sup>6</sup> |
|  | %        | 4                     | 68                    | 76                    | 25                    |
| <b>Kontrolna halda</b>                     |          |                       |                       |                       |                       |
| Ukupni hemoorganoheterotrofi               | CFU / g  | 9,7 x 10 <sup>5</sup> | 2,2 x 10 <sup>5</sup> | 3,2 x 10 <sup>5</sup> | 4,8 x 10 <sup>5</sup> |
| Bakterije koje razgrađuju ugljovodonike    |          | 5,6 x 10 <sup>4</sup> | 1,8 x 10 <sup>4</sup> | 2,2 x 10 <sup>4</sup> | 4,3 x 10 <sup>4</sup> |
|  | %        | 6                     | 8                     | 7                     | 9                     |

Zahtevani balans elemenata C : N : P : K ≈ 102 : 10 : 1 : 0,1 je postignut dodavanjem amonijum nitrata, diamonijum fosfata i kalijum hlorida. U toku bioremedijacije retencioni vodeni kapacitet se povećao od 26 do 32%, kao rezultat smanjenja koncentracije hidrofobnih jedinjenja i povećanja polarnosti halde. Maksimalna temperatura halde nije prelazila 55°C, što je važno za aktivnost prediminantnih mezofila.

S obzirom da je početna koncentracija bakterija koje razgrađuju ugljovodonike u haldi bila reda veličine  $10^4$  CFU /g, a u drugim eksperimentima je utvrđeno da kada je populacija ovih bakterija manja od  $10^5$  CFU /g ne postoji značajan stepen bioremediacionih procesa. Stoga je bilo neophodno povećati broj ovih bakterija.<sup>103</sup>

Izolovan i umnožen je zimogeni konzorcijum mikroorganizama (Poglavlje 3.4.3.) i halda je reinokulisana svakih 30 dana. Ukoliko se porede vrednosti za broj mikroba koji razgrađuju ugljovodonike u haldi i u kontrolnoj haldi (Tabela 4.11.) može se uočiti da je inokulacija i reinokulacija koja je bila praćena i biostimulacijom i aeracijom doprinela održanju neophodnog broja mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike poreklom iz nafte, koji je dostigao i do 76% od ukupnih hemoorganoheterotrofa u poređenju sa kontrolnom haldom (gde je povećanje dostiglo najvišu vrednost do 9%).

Pred kraj bioremedijacije broj mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike se smanjio u odnosu na ukupan broj hemoorganoheterotrofa na 25%. Prema objavljenim radovima biodiverzitet kontaminiranog zemljišta je vremenom opao zbog porasta broja mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike poreklom iz nafte i kao posledica toksičnog efekta kontaminanta.<sup>104</sup>

U kontrolnom uzorku detektovan je nedovoljan broj mikroorganizama sposobnih da kao jedini izvor ugljenika koriste ugljovodonike poreklom iz nafte što ukazuje da je bioremedijacijski potencijal nedovoljan za samoprečišćavanje ovog zemljišta.<sup>105</sup>

Jasan indikator uspešnosti bioremediacionog procesa je i opadanje vrednosti TPH (Tabela 4.11.) od 5,2 g/kg koliko je bilo na početku bioremedijacije do 0,3 g/kg TPH na kraju bioremedijacije (oko 94% ukupnih ugljovodonika nafte je razgrađeno u tom periodu). Degradacija se je najbrže odvijala u prvih 50 dana, a vremenom je stepen degradacije opadao.

Uočena je i korelacija između broja mikroorganizama koji koriste ugljovodonike nafte kao jedini izvor ugljenika i opadanja TPH u prvih 100 dana.<sup>84</sup>



### 4.3.1. Analiza izolovanih kultura mikroorganizama API testovima

Izolovani mikroorganizmi su analizirani komercijalnim API Biomerieux testovima. Upotrebljeni su testovi API 20 NE, API RAPID, API Coryne, API 50 CHB. Rezultati su prikazani u tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Identifikacija bakterijskih izolata API testovima

| API test       | Oznaka mikroorganizma | Identifikacioni profil | Identifikacija                      |
|----------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|
| API 20 NE      | NSH1                  | 0 140 455              | <i>Pseudomonas putida</i>           |
|                | 2NST8-1               | 1 354 475              | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       |
|                | 3NST8-2               | 0 356 557              | <i>Pseudomonas fluorescens</i>      |
|                | H162-1                | 1 044 654              | <i>Pseudomonas stutzeri</i>         |
|                | J7                    | 1 000 042              | <i>Acinetobacter lwoffii</i>        |
|                | BE''                  | 1 200 467              | <i>Achromobacter denitrificans</i>  |
|                | M1                    | 1 056 575              | <i>Pseudomonas sp.</i>              |
|                | BE'-4                 | /                      | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>    |
|                | BE'''-7               | /                      | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
|                | BE'-9                 | /                      | <i>Pseudomonas luteola</i>          |
| API 50 CHB     | H96-5K                | /                      | <i>Burkholderia cepacia</i>         |
|                | Bac1                  | /                      | <i>Bacillus cereus</i>              |
| API Coryne     | Bac3                  | /                      | <i>Bacillus licheniformis</i>       |
|                | J6                    | 1 000 004              | <i>Corynebacterium propinquum</i>   |
|                | M-9S                  | 0 110 004              | <i>Rhodococcus sp.</i>              |
| API Rapid 20 E | J8                    | 6 112 125              | <i>Brevibacterium sp.</i>           |
|                | FAM-5                 | /                      | <i>Serratia ficaria</i>             |
|                | BE'''- M              | /                      | <i>Aeromonas hydrophila</i>         |

Na osnovu precizne i pouzdane analize API testovima potvrđena je izolacija bakterija roda *Pseudomonas*. Potvrđeno je prisustvo i gram pozitivnih bakterija roda *Rhodococcus*.

## 4.4. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ISPITIVANIH KATALIZATORA

Ispitivani katalizatori su korišćeni u procesu hidrodosulfurizacije, pri čemu se sumpor uklanja iz prirodnog gasa i iz proizvoda nastalih rafinacijom nafte (benzina, raketnog goriva, kerozina i mazuta). Svrha uklanjanja sumpora iz ovih proizvoda je smanjenje emisije SO<sub>2</sub> u atmosferu, ali i negativne posledice koje nastaju stvaranjem sumporne

kiseline u procesu povećanja oktanskog broja benzina. Većina katalizatora koji se koriste u ovom procesu sadrže veće količine MoS<sub>2</sub> i manje drugih metala pošto većina metala katalizuje proces desulfurizacije. Najčešće su korišćeni prelazni metali (Cu, Mo, Ni, W), kao i kombinacije od dva ili više različitih metala. Nakon upotrebe ovakvi katalizatori mogu predstavljati izvor zagađenja teškim metalima i stoga su u ovom rasu ispitivane njihove hemijske osobine, ali i njihov uticaj na rast mikrobnog konzorcijuma. Rezultati karakterizacije ispitivanih katalizatora dati su u tabeli 4.13.

Tabela 4.13. Hemijske osobine ispitivanih katalizatora

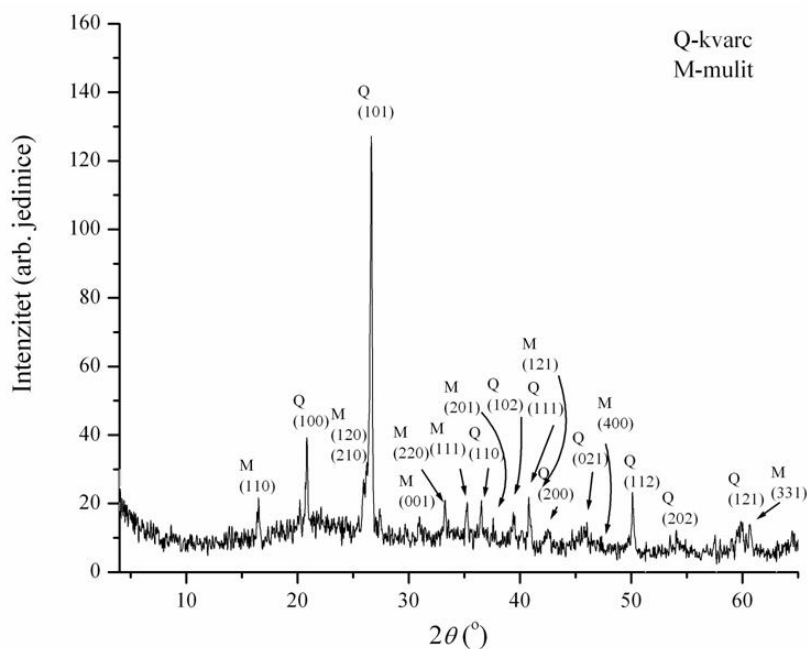
| Karakteristika                                   |                     | Katalizator |       |       |       |        |
|--|---------------------|-------------|-------|-------|-------|--------|
|  |                     | 1           | 2     | 3     | 4     | 5      |
| Osnovni hemijski parametri                       | Vlaga (%)           | 4,0         | 4,5   | 9,8   | 28    | 12,5   |
|  | pH                  | 3,7         | 3,8   | 3,54  | 9,95  | 2,8    |
|  | Pepeo (%)           | 91,20       | 92,71 | 84,59 | 7,69  | 94,00  |
|  | HES (g/kg)          | 5,29        | 1,39  | 1,20  | /     | /      |
|  | TPH (g/kg)          | 2,26        | 0,57  | 0,43  | /     | /      |
|  | Karbonati (%)       | /           | /     | 1,16  | /     | /      |
|  | CO <sub>2</sub> (%) | /           | /     | 0,51  | /     | /      |
| EOMA (%)   | Ukupni azot         | < 0,1       | /     | /     | 0,35  | /      |
|  | Ukupni ugljenik     | 2,27        | 0,32  | 0,64  | 83,38 | < 0,12 |
|  | Vodonik             | 0,51        | 0,65  | 0,90  | 2,16  | 0,54   |
|  | Sumpor              | 2,21        | 1,81  | 3,19  | /     | 0,87   |
| Ukupni metali (mg/g suve supstance)              | Arsen               | 2,05        | 0,007 | 0,31  | 0,001 | 2,77   |
|  | Gvožđe              | 4,58        | 0,932 | 9,12  | 2,26  | 2,56   |
|  | Kobalt              | 7,75        | 0,002 | 17,12 | 0,033 | 18,65  |
|  | Molibden            | 21,46       | 0,007 | 52,15 | 0,055 | 56,68  |
| Metali u vodenom ekstraktu (mg/g suve supstance) | Arsen               | 0,009       | 0,002 | 0,001 | 0,002 | 0,24   |
|  | Gvožđe              | /           | /     | /     | /     | 0,22   |
|  | Kobalt              | 7,73        | /     | 13,36 | /     | 8,77   |
|  | Molibden            | 6,30        | 0,001 | 24,45 | 0,001 | 34,43  |
| Količina ekstrahovane supstance (mg/g s.s.)      |                     | 275,7       | 206,6 | 378,8 | 78,1  | 97,0   |

Svi katalizatori sem katalizatora 4 imaju relativno slične osnovne hemijske parametre. U katalizatoru broj 4 je evidentno veće prisustvo organskog materijala.

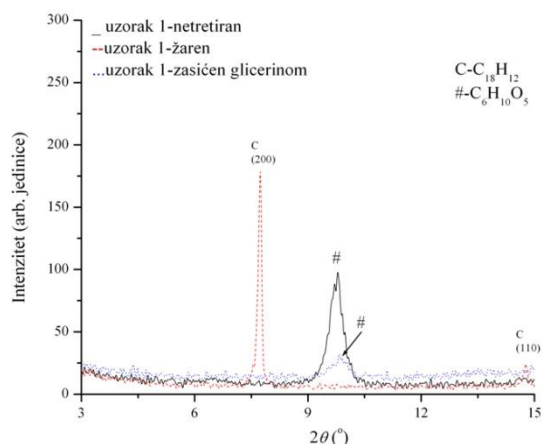
Nakon karakterizacije za dalje ispitivanje mikrobnog delovanja odabran je katalizator pod brojem 3, pre svega zbog najveće količine kobalta i molibdena. Katalizator 5 je takođe imao visoku koncentraciju molibdena, ali je zato koncentracija kobalta bila nešto niža.

#### 4.4.1. Rendgenska analiza ispitivanih katalizatora

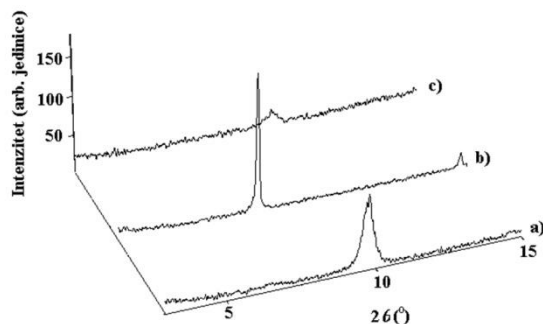
Da bi se odredio sastav i struktura katalizatora uzorci su ispitivani metodom rendgenske difrakcije na polikristalnom uzorku (prahu). U analiziranom uzorku 1 utvrđeno je prisustvo sledećih kristalnih faza: kvarc, mulit ( $\text{Al}_6\text{Si}_2\text{O}_{13}$ ). Kvarc je nešto više zastupljen od mulita. Obe kristalne faze imaju nizak stepen kristaliniteta. Osim pomenutih kristalnih faza u uzorku postoji i amorfna materija. Difraktogrami ispitivanog uzorka dati su na slikama 4.1. – 4.3.



Slika 4.1. Difraktogram praha integralnog uzorka 1



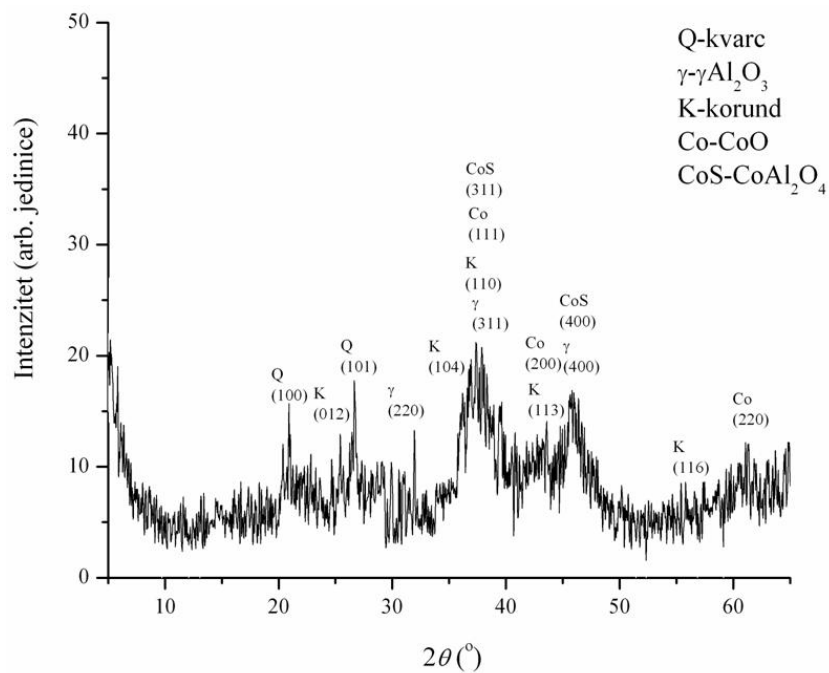
Slika 4.2. Difraktogrami praha orijentisanih preparata



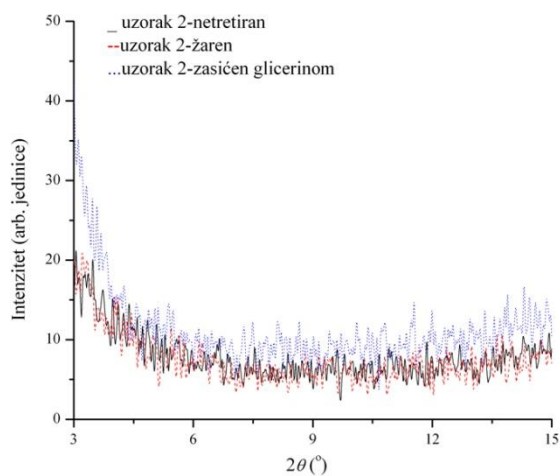
Slika 4.3. Difraktogrami praha orijentisanih preparata uzorka „1“ u 3D formi: a) netretirani uzorak, b) žareni uzorak, c) uzorak zasićen glicerinom.

U netretiranom orijentisanom preparatu postoji samo jedna refleksija na  $d \approx 9,05$  Å. Jako je teško na osnovu jedne refleksije tvrditi o kojoj je fazi reč, ali na osnovu literaturnih podataka moguće je da se radi o celulozi ( $C_6H_{10}O_5$ ) koja vodi poreklo iz aktivnog uglja. Udeo ove faze je vrlo nizak. Na žarenom uzorku postoje dve refleksije na  $d \approx 11,5$  i  $d \approx 6,0$  Å. Na osnovu prethodno navedenog moguće je da je došlo do transformacije celuloze na temperaturi od  $450$  °C u  $C_{18}H_{12}$  (chrysene) koji je čest sastojak katrana ugljeva. U uzorku zasićenom glicerinom postoji jedna slaba refleksija na  $d \approx 9,05$  Å koja pripada verovatno celulozi. Za potvrdu svega navedenog potrebna su dodatna ispitivanja.

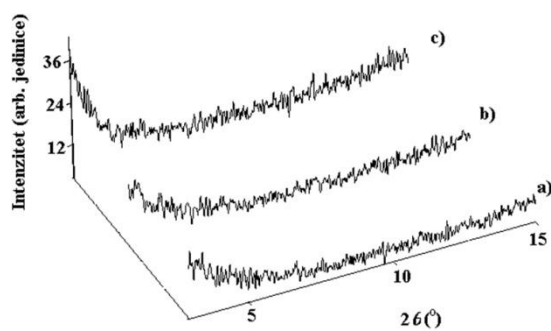
U uzorku 2 je utvrđeno prisustvo sledećih kristalnih faza: kvarc, korund ( $\alpha$ - $Al_2O_3$ ),  $\gamma$ - $Al_2O_3$ , CoO,  $CoAl_2O_4$ . Najzastupljenije faze su smeša  $\alpha$  i  $\gamma$   $Al_2O_3$ , dok je kvarc manje zastupljen. Moguće je da u analiziranom uzorku postoji Co/Ni (II) oksid i Co/Ni spinel, međutim za precizniju determinaciju su potrebna dodatna ispitivanja (npr. kvantitativna hemijska analiza ili analiza na skenirajućem elektronskom mikroskopu). Ukoliko ove faze postoje njihov sadržaj je nizak. Stepen kristaliniteta svih faza u uzorku je vrlo nizak pa je kvalitativna fazna analiza bila izuzetno otežana. Difraktogrami ispitivanog uzorka dati su na Slikama 4.4. – 4.6.



Slika 4.4. Difraktogram praha integralnog uzorka 2



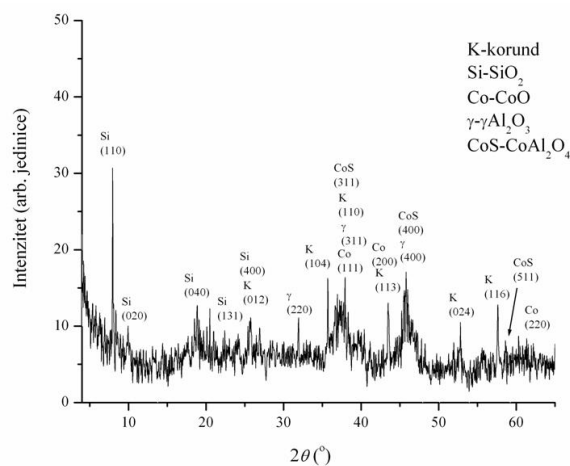
Slika 4.5. Difraktogrami praha orijentisanih preparata



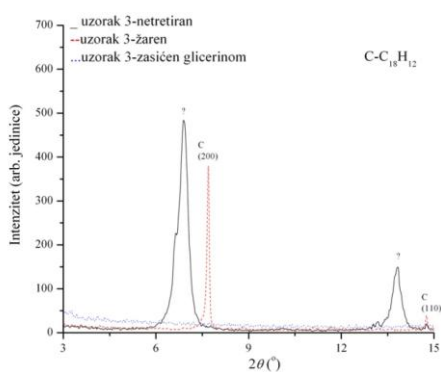
Slika 4.6. Difraktogrami praha orijentisanih preparata uzorka „2“ u 3D formi: a) netretirani uzorak, b) žareni uzorak, c) uzorak zasićen glicerinom.

U sva tri orijentisana preparata nije utvrđeno prisustvo nijedne refleksije.

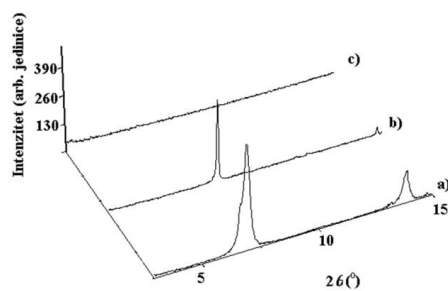
U uzorku 3 utvrđeno je prisustvo sledećih kristalnih faza:  $\text{SiO}_2$ , korund ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ),  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CoO}$ ,  $\text{CoAl}_2\text{O}_4$ . Najzastupljenija faza je modifikacija  $\text{SiO}_2$  koja se još naziva zeolit teta-1 (zeolite theta-1), pa nešto manje smeša  $\alpha$  i  $\gamma$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  sa tom razlikom što je ovde  $\alpha$  modifikacija (korund) nešto zastupljenija od  $\gamma$  modifikacije. Moguće je, kao i u prethodnom uzorku, da i u ovom postoji  $\text{Co/Ni}$  (II) oksid i  $\text{Co/Ni}$  spinel, međutim za precizniju determinaciju su potrebna dodatna ispitivanja. Ukoliko ove faze postoje njihov sadržaj je nizak. Osim pomenutih kristalnih faza u uzorku postoji i amorfna materija. Stepenn kristaliniteta svih faza u uzorku je vrlo nizak pa je kvalitativna fazna analiza bila izuzetno otežana. Difraktogrami ispitivanog uzorka dati su na slikama 4.7. – 4.9.



Slika 4.7. Difraktogram praha integralnog uzorka 3



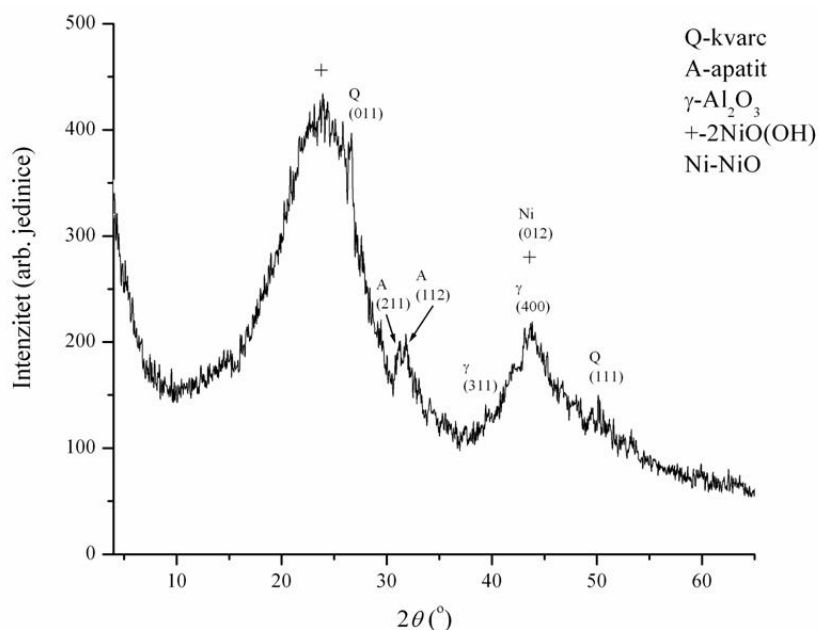
Slika 4.8. Difraktogrami praha orijentisanih preparata



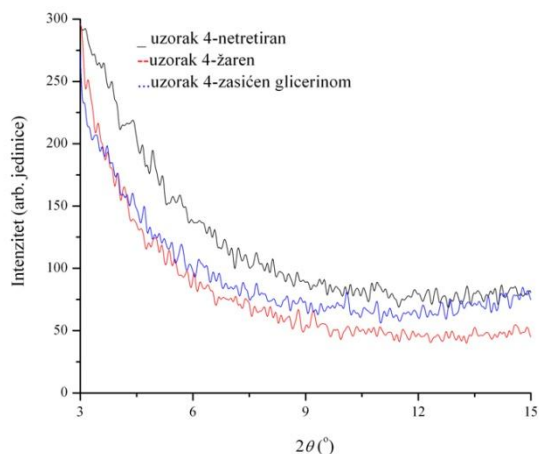
Slika 4.9. Difraktogrami praha orijentisanih preparata uzorka „3“ u 3D formi: a) netretirani uzorak, b) žareni uzorak, c) uzorak zasićen glicerinom.

U netretiranom orijentisanom preparatu postoje dve refleksije na  $d \approx 12,8$  i  $d \approx 6,40$  Å. Jako je teško na osnovu samo dve refleksije tvrditi o kojoj je fazi reč, ali je najverovatnije reč o organskoj kristalnoj materiji. Udeo ove faze je vrlo nizak (ove refleksije ne vide na difraktogramu integralnog uzorka). Na žarenom uzorku postoje dve refleksije na  $d \approx 11,5$  i  $d \approx 6,0$  Å. Vrlo je moguće da je došlo do transformacije organske materije na temperaturi od 450 °C u  $C_{18}H_{12}$  (chrysene), kao kod uzorka 1. U uzorku zasićenom glicerinom ne postoji ni jedna refleksija.

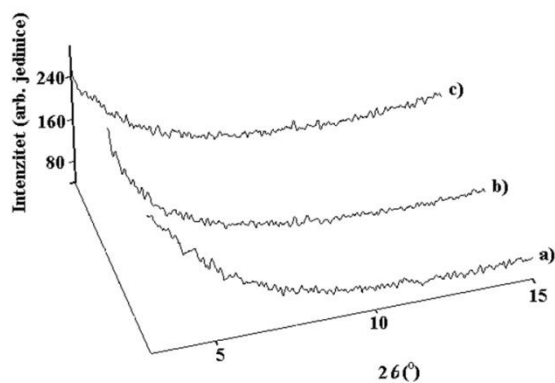
U uzorku 4 najdominantnije je zastupljena amorfna, najverovatnije, organska materija (dve velike amorfne refleksije na difraktogramu). U analiziranom uzorku moguće je prisustvo sledećih kristalnih faza: kvarc,  $\gamma$ - $Al_2O_3$ , apatit ( $Ca_5(PO_4)_3(F,Cl,OH)$ ), ali u vrlo maloj količini. Moguće je da u analiziranom uzorku postoji i  $2NiO(OH)$  i  $NiO$ , takođe u maloj količini. Za potvrdu svega navedenog potrebna su dodatna ispitivanja (npr. kvantitativna hemijska analiza i/ili analiza na skenirajućem elektronskom mikroskopu). Stepenn kristaliniteta je izuzetno nizak pa je kvalitativna fazna analiza praktično nemoguća. Difraktogrami ispitivanog uzorka dati su na Slikama 4.10. – 4.12.



Slika 4.10. Difraktogram praha integralnog uzorka 4



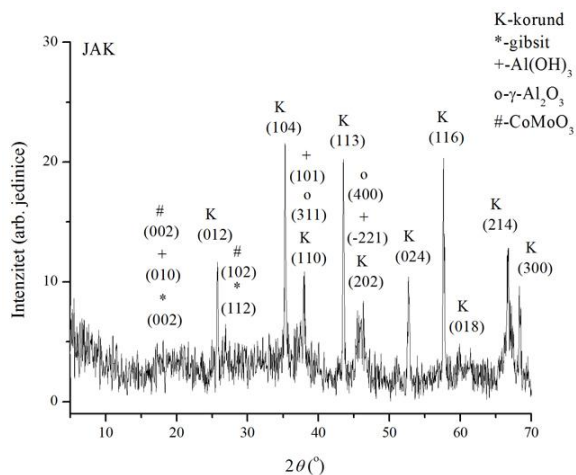
Slika 4.11. Difraktogrami praha orijentisanih preparata



Slika 4.12. Difraktogrami praha orijentisanih preparata uzorka „4“ u 3D formi: a) netretirani uzorak, b) žareni uzorak, c) uzorak zasićen glicerinom.

U sva tri orijentisana preparata nije utvrđeno prisustvo ni jedne refleksije.

Rendgenskom difrakcionom analizom uzorka katalizatora br. 5, utvrđeno je prisustvo sledećih kristalnih faza: korund ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ), gipsit  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{CoMoO}_3$ .  $\text{Al}(\text{OH})_3$  razlikuje se od gipsita po kristalnoj stukturi. Stepen kristalniteta korunda, koji je apsolutno najdominantnija faza u uzorku, je relativno nizak, mada je i kod ostalih faza izuzetno nizak. Udeo amorfne faze je vrlo visok. Difraktogram ispitivanog uzorka dat je na Slici 4.13.



Slika 4.13. Difraktogram praha integralnog uzorka 5



#### **4.4.2. Ispitivanje inhibitornog efekta molibdena i kobalta na izolovan konzorcijum mikroorganizama**

Inhibitorni efekat metala iz katalizatora je ispitivan za molibden u opsegu koncentracija od 250 – 6000 mg/dm<sup>3</sup>, a to je odgovaralo koncentracijama kobalta u opsegu od 64 – 1538 mg/dm<sup>3</sup>. Vodeni ekstrakt katalizatora (pripremljen kao što je opisano u poglavlju 3.2.16.) je dodavan u mikrobiološku podlogu (Poglavlje 3.4.1(i))u navedenim koncentracijama. Na podlogu je zasejan konzorcijum mikroorganizama i posle 48h je određivan njihov broj.

Na svim ispitivanim koncentracijama metala uočen je rast mikroorganizama i stoga se smatra da na njima nema toksičnog efekta ovih metala. Konzorcijum mikroorganizama se dakle može koristiti za bioremedijaciju otpada u kome se pored zagađenja koje vodi poreklo od nafte nalaze i ispitivani katalizatori.

### **4.5. KARAKTERIZACIJA HUMINSKIH KISELINA**

Huminske kiseline su glavna komponenta humnskih supstanci, glavnog sastojka zemljišta. Nastaju biološkom degradacijom nežive organske supstance. Huminske kiseline ne predstavljaju neku određenu kiselinu, već kompleksnu smešu većeg broja kiselina koje sadrže međusobno povezana aromatična jezgra, karboksilne i fenolne grupe. Prisustvo ovih grupa omogućava huminskim kiselinama vezivanje kompleksnih jedinjenja sa jonima metala (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup>).

#### **4.5.1. Elementarna analiza**

Elementarna analiza huminskih kiselina ekstrahovanih iz zemljišta kontaminiranog mazutom i standarda huminskih kiselina, kao i odnosi atoma H/C i sadržaj pepela dati su Tabeli 4.14.

Tabela 4.14. Elementarna analiza ekstrahovanih huminskih kiselina i standarda huminskih kiselina, sadržaj pepela i odnos H/C.

| Huminske<br>kiseline | EOMA (%) |      |      |      | H/C* | Pepeo<br>(%) |
|----------------------|----------|------|------|------|------|--------------|
|                      | C        | H    | N    | S    |      |              |
| Ekstrahovane         | 52,15    | 4,39 | 0,69 | 1,05 | 1,01 | 13,40        |
| Standard             | 43,21    | 4,12 | 0,33 | 1,45 | 1,14 | 30,78        |

$$*H/C = [(\%H/1,008)/(\%C/12,01)]$$

Ekstrahovane huminske kiseline imaju veći sadržaj ugljenika i azota u poređenju sa standardom, a manji sadržaj sumpora i pepela. Odnos H/C se povezuje sa nivoom kondenzovanja, tj. aromatizacijom, a to ukazuje na stepen humifikacije. Veća vrednost H/C kod komercijalno dostupnog standarda huminskih kiselina ukazuje na veći sadržaj alifatičnih komponenti, što je tipično za manje humificiran materijal u odnosu na ekstrahovane huminske kiseline gde je veći sadržaj kondenzovanih struktura.

#### 4.5.2. Optička gustina

Karakter optičkih svojstava, a među njima i optičke gustine huminskih supstanci određuje njihova hemijska građa. Huminske supstance koje imaju veću molekulsku masu i stepen kondenzacije optičku gustinu (apsorbancu) pokazuju na 465 nm. Međutim, humusne supstance sa manjom molekulskom masom i fulvinske kiseline, koje takođe imaju veliki bioaktivni efekat su manje apsorptivne na ovoj talasnoj dužini i ne mogu se određivati.

Da bi se odredila optička gustina uzorka u kome se nalaze huminske i fulvinske kiseline koristi se odnos  $E_4 / E_6$  (odnos apsorbanci na 465 i 665 nm). Naime, ovaj odnos raste kako opada prosečna molekulska masa uzorka, što znači da ukoliko je ovaj odnos veći veće je i prisustvo fulvinskih kiselina u odnosu na huminske.

Određivanje optičke gustine huminskih kiselina je izvedeno je na talasnim dužinama 465 nm i 665 nm. Huminske kiseline su izolovane iz zemljišta na kome je rađena bioremedijacija, a uzorci su uzimani na početku bioremedijacije, nakon 30, 60, 75, 135 i 165 dana. Odnosi  $E_4 / E_6$  su dati u Tabeli 4.15.

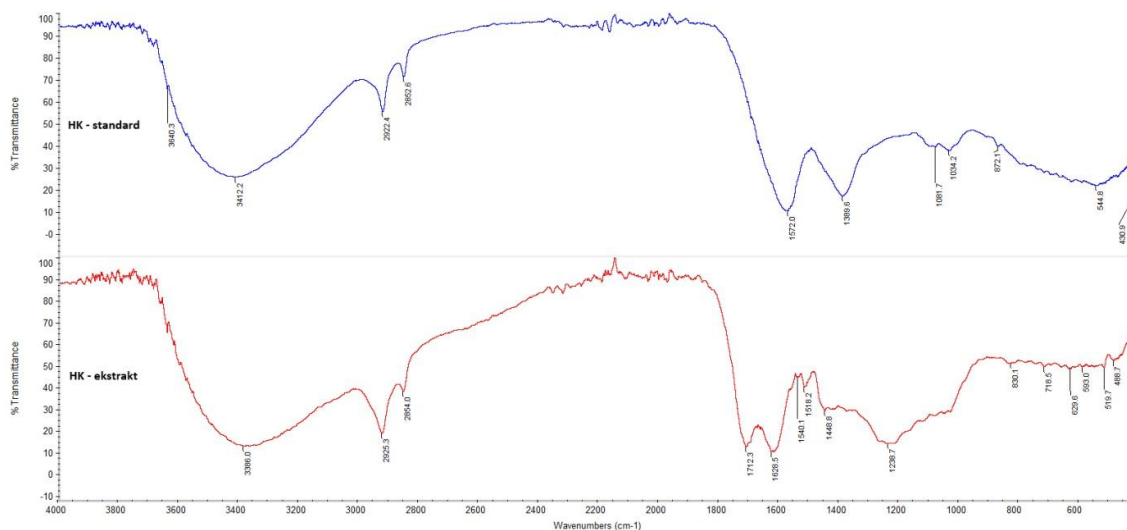
Tabela 4.15. Sadržaj huminskih kiselina i odnos  $E_4 / E_6$ 

| Trajanje bioremedijacije (dani) | Sadržaj huminskih kiselina (%) | $E_{465}$ | $E_{665}$ | $E_4 / E_6$ |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------|-------------|
| 0                               | 1,92                           | 0,370     | 0,172     | 2,15        |
| 30                              | 2,08                           | 0,378     | 0,171     | 2,21        |
| 60                              | 2,30                           | 0,389     | 0,169     | 2,30        |
| 75                              | 2,62                           | 0,403     | 0,166     | 2,43        |
| 135                             | 2,72                           | 0,437     | 0,159     | 2,75        |
| 165                             | 2,83                           | 0,595     | 0,154     | 3,86        |

Iz table 4.15. se vidi da što je duže vreme bioremedijacije, sadržaj huminskih kiselina i odnos optičkih gustina huminskih kiselina na 465 i 665 nm ( $E_4 / E_6$ ) raste.

### 4.5.3. FTIR spektroskopija

Na slici 4.14. su prikazani uporedni FTIR spektri komercijalnog standarda huminskih kiselina i ekstrahovanih huminskih kiselina



Slika 4.14. Uporedni prikaz FTIR spektara standarda i ekstrahovanih huminskih kiselina

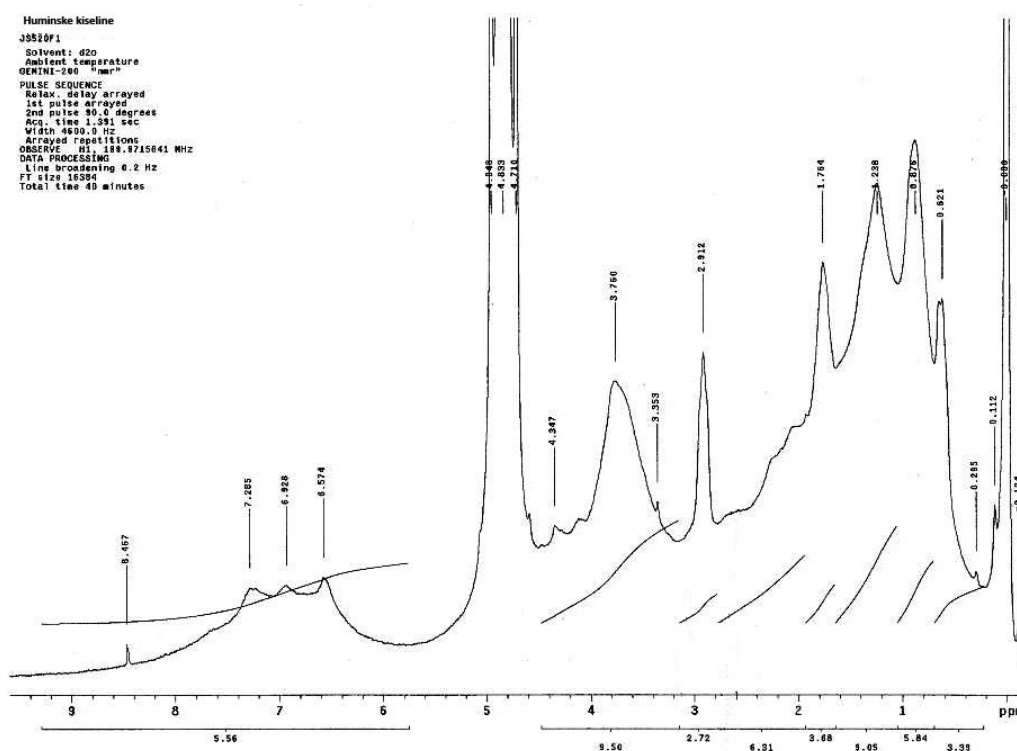
Iz širokog pika u oblasti od  $3000\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$  se može zaključiti da ekstrahovane huminske kiseline imaju veći sadržaj OH grupa. Veći pikovi kod ekstrahovanih

huminskih kiselina na oko 2920 i 2850  $\text{cm}^{-1}$  u odnosu na standar ukazuju da ekstrahovane huminske kiseline imaju relativno više alifatičnih grupa.

Pikovi na 1712 i 1628  $\text{cm}^{-1}$  kod ekstrahovane huminske kiseline bi mogli da ukazuju na prisustvo karbonilnih grupa, a pik na 1572 kod standardne huminske kiseline na veću količinu  $\text{COO}^-$  grupe.<sup>108</sup>

#### 4.5.4. $^1\text{H}$ NMR spektroskopija

Na slici 4.15. je prikazan  $^1\text{H}$  NMR spektar ekstrahovanih huminskih kiselina.



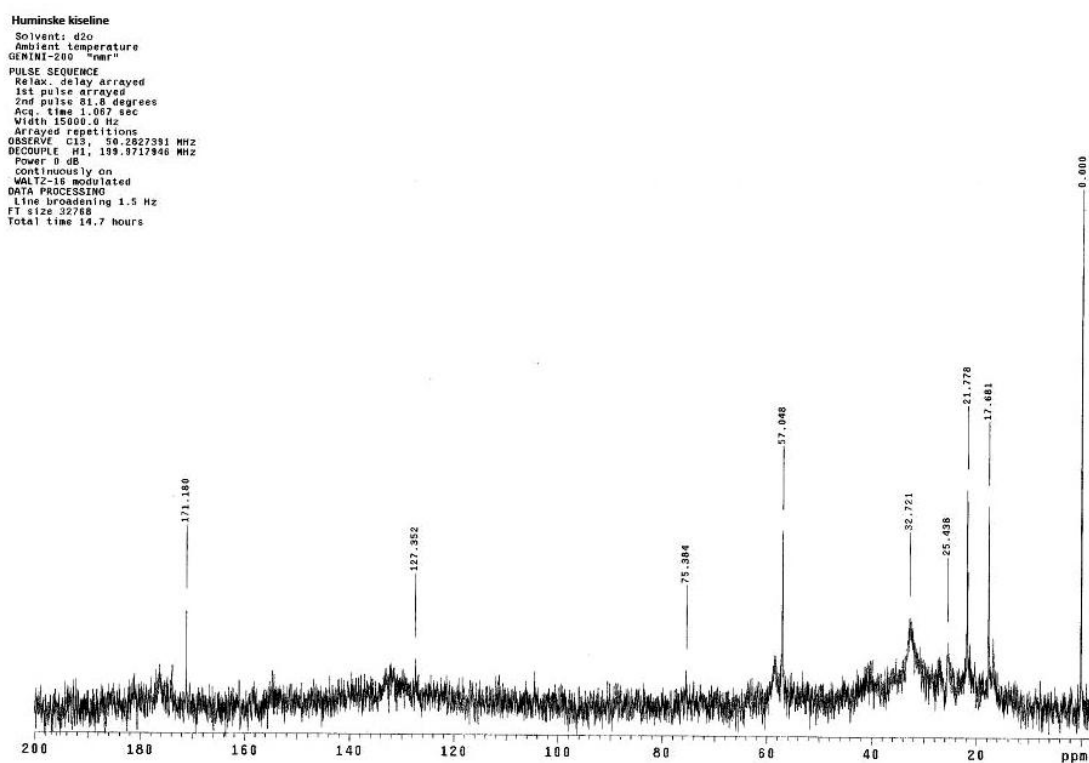
Slika 4.15.  $^1\text{H}$  NMR spektar ekstrahovanih huminskih kiselina

Na spektru je uočljiv oštar singlet na 8,4 ppm koji bi mogao poticati od rezonancije fenolnih protona OH grupe. Pik na oko 7,2 ppm je tipičan za aromatične protone, dok signal na oko 6,5 ppm može biti od bifenilnog protona ili od rezonancije aromatičnog protona u prstenu gde je supstituisana amino grupa u *orto*- ili *para*- položaju. Kad su signali na položajima od 7,4 do 6,3 jači (kao što je to ovde slučaj) to može ukazivati na povećanu aromatičnost huminskih kiselina.

Jak signal na oko 3,75 ppm ukazuje na prisustvo metil ili metilenske grupe vezane za atom azota ili kiseonika. Singlet na oko 1,75 ppm pripada protonu iz grupe  $-\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$ .

#### 4.5.5. $^{13}\text{C}$ NMR spektroskopija

Na slici 4.16. je prikazan  $^{13}\text{C}$  NMR spektar ekstrahovanih huminskih kiselina.



Slika 4.16.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar ekstrahovanih huminskih kiselina

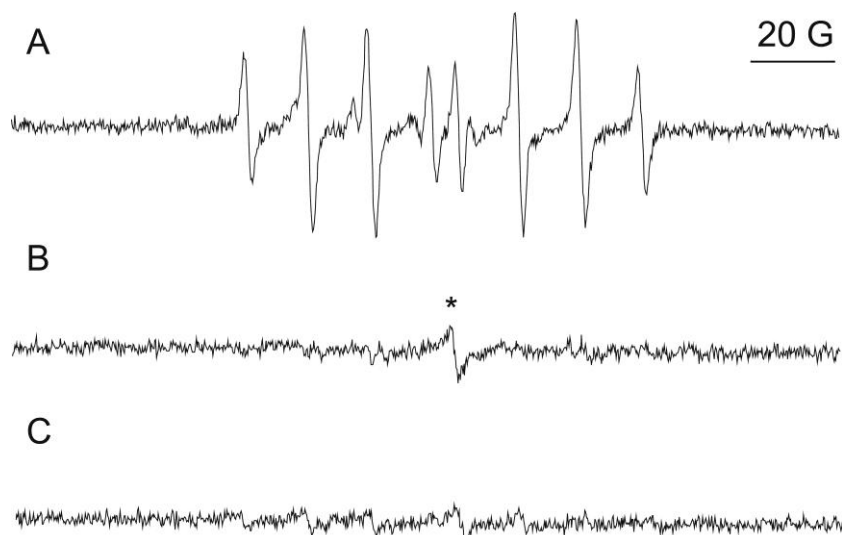
Spekar na slici 4.16. prikazuje slabu rezoluciju. Moguće je razlikovati samo neke grupe prisutne u strukturi huminskih kiselina. Signali na oko 25,4 i na oko 41 ppm pripadaju metil i metilenskim grupama u alifatičnom delu lanca. Jači signal na oko 32,7 ppm pripada metilenskom ugljeniku iz dugih alifatičnih jedinjenja. Pikovi na oko 130 ppm odgovaraju aromatičnim strukturama, a pikovi na oko 170-180 ppm potiču od karboksilnog, amidnog ili estarskog ugljenikovog atoma.

## 4.6. EFEKAT HUMINSKIH KISELINA NA RAST ZIMOGENOG KONZORCIJUMA MIKROORGANIZAMA

Visoko reaktivni i potencijalno štetni slobodni radikali se brzo stvaraju u okruženju sa kiseonikom i stoga su veoma prisutni i u biološkim sistemima. Biljke i životinje se štite od štetnog delovanja slobodnih radikala uz pomoć antioksidativnih molekula kao što su vitamini C i E. Smatra se da i zemljište sadrži antioksidanse koji su po strukturi polifenoli. Pokazano je i da huminske supstance sadrže stabilne poluhinonske slobodne radikale čija se koncentracija povećava u toku humifikacije. Smatra se da ove poluhinonske vrste potiču iz reakcije fenolnih jedinjenja sa reaktivnim radikalima. Vezivanjem radikala fenolna jedinjenja deluju kao oksidansi koji prekidaju oksidativnu lančanu reakciju raspadanja organske supstance zemljišta.<sup>109</sup>

### 4.6.1. Praćenje antioksidativnog kapaciteta huminskih kiselina

Rezultati EPR spektroskopije kojom se prati tok Haber-Vajsove reakcije (HWS) prikazan je na Slici 4.17.

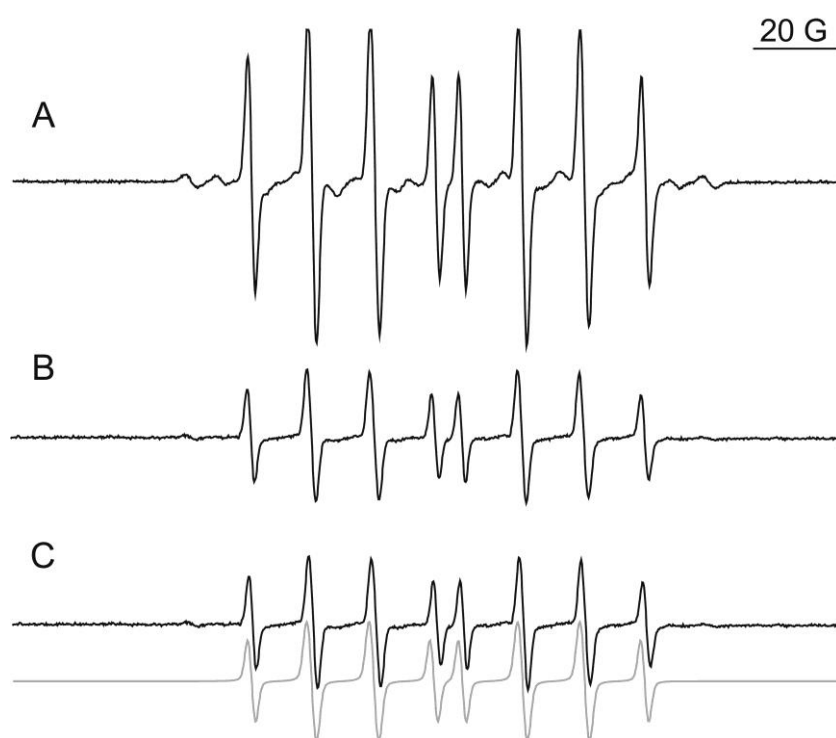


Slika 4.17. EPR spektar DEPMPPO/OH adukta u:

A) HWS; B) HWS + standard huminskih kiselina, Relativna inhibicija (RI) =  $0,93 \pm 0,05$ , \* - nepoznati organski radikal; C) HWS + ekstrakt huminskih kiselina, RI =  $0,89 \pm 0,12$ .

Rezultati predstavljeni na slici 4.17. ukazuju na direktnu reakciju huminskih kiselina sa reaktivnim vrstama kiseonika (ROS) koje su stvorene u HWS što dalje dovodi do stvaranja ugljenik-vezanih radikala. Huminske kiseline neposredno dovode do uklanjanja ROS-a.

Kada se EPR spektroskopija sprovodi u Fentonovom sistemu, glavni proizvod je hidroksil radikal. Huminske kiseline sprečavaju stvaranje hidroksil radikala u Fentonovom sistemu. (Slika 4.18.).



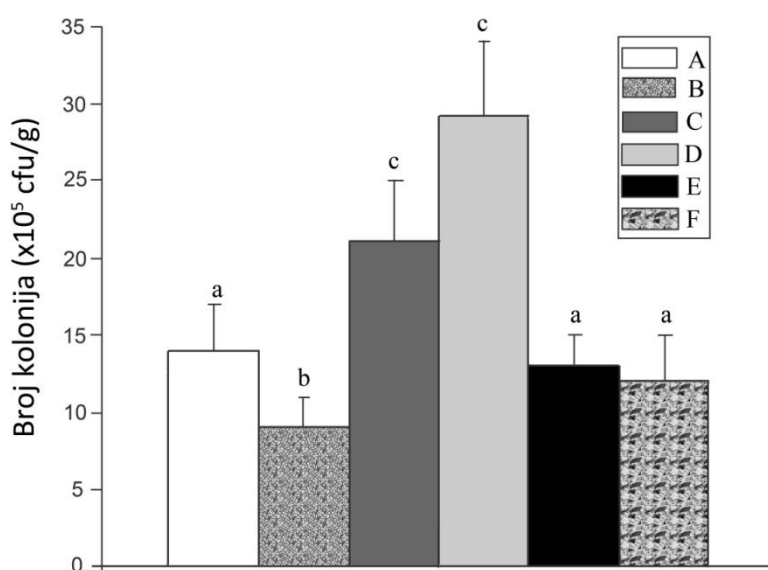
Slika 4.18. EPR spektar u DEMPO/OH aduktu u:

- A) Fentonovom sistemu (FS); B) FS + standardu huminskih kiselina,  $RI = 0,59 \pm 0,04$ ;  
C) FS + ekstraktu huminskih kiselina,  $RI = 0,44 \pm 0,10$ . Sivo – spektralna simulacija signala DEPMPO/OH adukta

Rezultati prikazani na slikama 4.17. i 4.18. pokazuju da ispitivane huminske kiseline utiču na HWS i FS, ukazujući da huminske kiseline direktno utiču na vezivanje hidroksil radikala tako što vezuju  $Fe^{3+}$ .

#### 4.6.2. Praćenje efekta huminskih kiselina na rast konzorcijuma

S obzirom da huminske kiseline mogu da kompleksiraju teške metale, može se pretpostaviti da mogu da pokažu i zaštitni efekat pri izloženosti ćelija toksičnom metalima kao što je  $\text{Fe}^{3+}$ . Konzorcijum mikroorganizama izolovan po proceduri u poglavlju 3.4.3. je gajen 96 sati na podlozi uz dodatak subinhibitorne koncentracije  $\text{FeCl}_3$ . Uočeno je da  $\text{FeCl}_3$  dovodi do smanjenja rasta konzorcijuma. Dodatkom huminskih kiselina toksični efekat  $\text{FeCl}_3$  nestaje što je predstavljeno na slici 4.19.



Slika 4.19. Histogram rasta konzorcijuma mikroorganizama u različitim sistemima A: Konzorcijum mikroorganizama (KM); B: KM +  $\text{FeCl}_3$ ; C: KM + standard huminskih kiselina; D: KM + ekstrakt huminskih kiselina; E: KM +  $\text{FeCl}_3$  standard huminskih kiselina; F: KM +  $\text{FeCl}_3$  + ekstrakt huminskih kiselina. Mala slova označavaju statistički značajne razlike

Metabolizam gvožđa je veoma važan za svaku živu ćeliju i njegovo prisustvo je neophodno za odvijanje mnogih bioloških reakcija. Ali, zbog reaktivne prirode, gvožđe je veoma toksično za organizam ukoliko njegova unutarćelijska koncentracija nije adekvatno regulisana. Toksičnost  $\text{Fe}^{3+}$  jona je zasnovana na njegovoj mogućnosti da reaguje sa super-oksidadom u HWS pri čemu se stvara  $\text{Fe}^{2+}$ .<sup>110</sup>



Dodatkom huminskih kiselina dolazi do slabljenja negativnog efekta  $\text{FeCl}_3$  na rast mikroorganizama. Smatra se da huminske kiseline uklanjaju  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>111</sup> svojim vezivanjem za metale kao što su mangan, bakar i gvožđe. Ovi metali su redoks aktivni i reaguju sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  u Fentonovoj reakciji pri čemu se stvara hidroksil radikal ( $\bullet\text{OH}$ ) koji se dalje uklanja od strane huminskih kiselina.

Ovi rezultati pokazuju da huminske kiseline deluju po dva mehanizma: uklanjanjem  $\bullet\text{OH}$  radikala i inaktivacijom feri jona ( $\text{Fe}^{3+}$ ) taloženjem u Fentonovoj reakciji.

Važno je naglasiti da i sami mikroorganizmi stvaraju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\bullet\text{O}_2^-$ , kao neizbežne posledice aerobnog metabolizma. Ali neki mikroorganizmi mogu i “namerno” oslobađati  $\text{H}_2\text{O}_2$  u podlogu u cilju suzbijanja rasta drugih kompetitorskih mikroorganizama,<sup>112</sup> a za sprečavanje rasta mikroorganizama dovoljna je i koncentracija od 0,1 do 8  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>113</sup>

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovu svih izloženih i diskutovanih rezultata, mogu se formulisati sledeći zaključci:

- Rezultati određivanja metala ekstrahovanih carskom vodom u poređenju sa nacionalnom i EU legislativom ukazuju da je u nekim sedimentima prisutan veći sadržaj metala (Cd, Cu, Pb, Zn, Ni i Hg) od dozvoljenog. Zagađenje potiče od industrijske aktivnosti i blizine saobraćajnica.
- Ispitivane koncentracije Mo i Co koje potiču iz otpadnih katalizatora nisu toksične za izolovani konzorcijum mikroorganizama i on se stoga može koristiti za bioremedijaciju otpada u kome se pored ugljovodoničnog zagađenja nalaze i ispitivani metali.
- U procesu bioremedijacije zemljišta kontaminiranog naftom sa izolovanim konzorcijumom mikroorganizama TPH je smanjen sa 5,2 na 2,1; 1,3; i 0,3 g/kg zemljišta posle 50, 100, 150 dana, što znači da je procenat biodegradacije TPH iznosio 60, 75 i 94%. Prosečna brzina biodegradacije mazuta je iznosila 33 mg/kg/dan. Degradacija je bila najbrža tokom prvih 50 dana (62 mg/kg/dan) i smanjila se sa vremenom (16 mg/kg/dan od 50-100 dana) i (20 mg/kg/dan). Rezidualna koncentracija TPH posle 5 meseci bioremedijacije je iznosila manje od jedne desetine početne, a koncentracija mazuta smanjena je za 3,1 g/kg tokom prvih 50 dana, 0,8 g/kg tokom 50-100 dana i 1,0 g/kg tokom 100-150 dana.
- Na osnovu analize API testovima potvrđena je izolacija sledećih sojeva: *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. luteola*, *Acinetobacter lwoffii*, *Achromobacter denitrificans*, *Rhodococcus sp.*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *Corynebacterium propinquum*, *Brevibacterium sp.* i *Serratia ficaria*.
- Uočena je i korelacija između udela mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike koji potiču iz nafte i smanjenja TPH tokom prvih 100 dana

studije. Naime, udeo ovih mikroorganizama se u broju ukupnih hemoorganoheterotrofa u prvih 50 dana povećava sa 4 na 68%, dok je TPH smanjena na 40% od početne vrednosti. Od 50 do 100 dana, udeo mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike poreklom iz nafte se dalje povećao na 76%, a TPH je smanjen na 25% od početne vrednosti. U poslednjih 50 dana, njihov udeo je sveden na samo 25%, dok je TPH u istom periodu smanjena na 6% od početne vrednosti. Pearson-ov koeficijent korelacije za ove dve vrednosti je 0,996 od 0-100 dana. Moguće objašnjenje za činjenicu da je procenat ovih mikroorganizama smanjen sa 76% posle 100 dana, na samo 25% od ukupnog broja mikroorganizama posle 150 dana, je povećanje broja ukupnih hemoorganoheterotrofa ali i da je došlo do smanjenja koncentracije naftnih ugljovodonika koje mikroorganizmi koji kao jedini izvor ugljenika koriste ugljovodonike nafte upotrebljavaju kao izvor ugljenika kao i da je posledica smanjene toksičnosti i povećanje raznovrsnosti mikrobne populacije u zemljištu. Ukupan broj ovih mikroorganizama je ostao stabilan do kraja bioremedijacije (oko  $10^6$  CFU/g).

- Ispitivanje prisustva PFC-a u sedimentu je jedno od prvih ove vrste na teritoriji naše zemlje. Od svih PFC-a najprisutniji je PFOS iako nije direktno korišćen u industrijskoj proizvodnji koja je direktno vezana za kanal otpadnih voda južne industrijske zone u Pančevu.
- Rezultati EPR spektroskopije na HWS ukazuju da huminske kiseline direktno reaguju sa ROS koje su dobijene u HWS.
- Rezultati EPR spektroskopije na FS ukazuju da huminske kiseline inhibiraju nastajanje hidroksil radikala.
- Istraživanje uloga huminskih kiselina u rastu zimogenog konzorcijuma mikroorganizama igra važnu ulogu u razvoju čistih tehnologija koje se mogu primeniti u svim staništima, posebno zemljištu (bioremedijacija), ali i kod visokih nivoa zagađenja vode i vazduha.

## **5. LITERATURA**

1. E.P. Odum, Fundamentals of ecology, third edition, Saunders, New York 1971
2. E.D. Schulze, E. Beck, K. Müller-Hohenstein, Plant Ecology, Springer, Berlin, 2005
3. C.F. Stuart, P.A. Matson, H.A. Mooney, Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology, Springer, New York, 2002
4. T.C. Brown, J.C. Bergstrom, J.B. Loomis, Nat. Resour. J. 47 (2007) 329
5. N.L. Christensen, A.M. Bartuska, J.H. Brown, S. Carpenter, C. D'Antonio, R. Francis, J.F. Franklin, J.A. MacMahon, R.F. Noss, D.J. Parsons, C.H. Peterson, M.G. Turner, R.G. Woodmansee, Ecol. Appl. 6 (1996) 665
6. R.E. Grumbine, Conserv. Biol. 8 (1994) 27
7. H. Jenny, Factors of soil formation, Dover Publication, INC, New York, 2005;
8. E. W. Hilgard, Soils, The Macmillan Company, New York, 1914
9. E. Ramann, The Evolution and Classification of Soils, W. Heffer & Sons, Ltd., London, 1928
10. J. S. Joffe, Pedology, Rutgers University Press, New Brunswick, N. J., 1936
11. R.P. Voroney, in The Soil Habitat in Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry, E.A. Paul Ed., Elsevier, 2007
12. Soil Survey Staff, Keys to Soil Taxonomy, United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service, Ninth Edition, 2003
13. J. Sastre, A. Sahuquillo, M. Vidal, G. Rauret, Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction, Anal. Chim. Acta 462 (2002) 59
14. F.J. Stevenson, Humus chemistry. Genesis, composition, reactions, Second Edition, John Wiley and sons, New York, 1994.
15. I.A. Mirsal, Soil Pollution – Origin, Monitoring & Remediation, 2<sup>nd</sup> Ed., Springer, 2008
16. E.A. Ghabbour, G. Davies, Humic substances, Royal Society of Chemistry, 2001
17. N.L. Wolfe, D.L. Macaladz, J. Contam. Hydrol. 9 (1992) 17
18. D.R. Lovley, J.D. Coates, E.L. Blunt-Harris, E.J.P. Phillips, J.C. Woodward, Nature 382 (1996), 445
19. N. Sensei, Y. Chen, M. Schnitzer, Soil Biol. Biochem. 9 (1997), 371

20. R. Francois, *Reviews Aquatic Sciences* 3 (1990), 41
21. S. A. Waksman, *Principles of soil microbiology*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, MD, 1932
22. T.K. Kirk, R.L. Farrell, *Annu. Rev. Microbiol.* 41 (1987), 465
23. J.A. Rice, P. MacCarthy, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 1875
24. E. Lichtfouse, *A novel model of humin – analysis* 27, No. 5EDP Sciences, Wiley-VCH, 1999
25. V.P. Beškoski, *Proučavanje aktivnosti konzorcijuma zimogenih mikroorganizama zemljišta zagađenog naftom i njenim derivatima i njihova primena za bioremedijaciju*; Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Beograd, 2011
26. E.R. Hinchee, H.J. Kite, *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*, Battle Press, Columbus, 1995
27. D.A. Marković, Š.A. Đarmati, I.A. Gržetić, D.S. Veselinović, *Fizičko-hemijski osnovi zaštite životne sredine, Izvori zagađivanja, posledice i zaštita*, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1996
28. E.A. Paul, *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, Elsevier 2007
29. E. Kothe, A. Varma, *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils*, Springer 2012
30. A. Warhurst, in *Environmental policy in mining: corporate strategy and planning for closure*, A. Warhurst, L. Noronha, Eds. CRC, Boca Raton, FL, 2002
31. W. Salomons, U. Förstner, *Metals in the hydrocycle*, Springer-Verlag, Berlin, 1984
32. Council Directive 86/278/EEC, on the Protection of the Environment, and in Particular of the soil, When Sewage Sludge is used in Agriculture Official Journal L 181, 1986, pp. 6–12.
33. US EPA 3050b Method, *Acid digestion of sediments, sledges, and soils*, Washington, DC, 1996
34. M. Chen, L.Q. Ma, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65 (2001) 491
35. V.P. Beškoski, S. Takemine, T. Nakano, L. Slavković Beškoski, G. Gojgić-Cvijović, M. Ilić, S. Miletić, M.M. Vrvic, *Chemosphere* 91 (2013) 1408

36. G. Olsen, D. Ehresman, J. Froehlich, J. Burris, J. Butenhoff, Evaluation of the half-life ( $t_{1/2}$ ) of elimination of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorohexanesulfonate (PFHS) and perfluorooctanoate (PFOA) from human serum. FLUOROS. In: An International Symposium on Fluorinated Alkyl Organics in the Environment, 2005, Univ. Toronto, 2005, TOX 017
37. C. Chaemfa, J.L. Barber, S. Huber, K. Breivik, K.C. Jones, J. Environ. Monit. 12 (2010) 1100
38. M. Shoeib, P. Vlahos, T. Harner, A. Peters, M. Graustein, J. Narayan, Atmos. Environ. 44 (2010) 2887
39. L. Ahrens, S. Felizeter, R. Ebinghaus, Chemosphere 76 (2009) 179
40. L. Ahrens, S. Felizeter, R. Sturm, Z.Y. Xie, R. Ebinghaus, Mar. Pollut. Bull. 58 (2009) 1326
41. T. Wang, J.S. Khim, C. Chen, J.E. Naile, Y. Lu, K. Kannan, J. Park, W. Luo, W. Jiao, W. Hu, J.P. Giesy, Environ. Int. 42 (2012) 37
42. C.P. Higgins, J.A. Field, C.S. Criddle, R.G. Luthy, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 3946
43. A.M. Becker, S. Gerstmann, H. Frank, Environ. Pollut. 156 (2008) 818
44. Y. Zushi, M. Tamada, Y. Kanai, S. Masunaga, Environ. Pollut. 158 (2010) 756
45. Y. Pico, C. Blasco, M. Farré, D. Barceló, Environ. Sci. Pollut. Res. 19 (2012) 946
46. N. Theobald, C. Caliebe, W. Gerwinski, H. Hühnerfuss, P. Lepom, Environ. Sci. Pollut. Res. 19 (2012) 313
47. A. Kärrman, J.L. Domingo, X. Llebaria, M. Nadal, E. Bigas, B. Van Bavel, G. Lindström, Environ. Sci. Pollut. Res. 17 (2010) 750
48. L. Ahrens, J. Environ. Monit. 13 (2011) 20
49. L.S. Haug, S. Huber, G. Becher, C. Thomsen, Environ. Int. 37 (2011) 687
50. N. Theobald, S. Schäfer, A.C. Baass, C. Schröter-Kermani, Organohalogen Compd. 73 (2011) 440
51. K. Croes, A. Colles, G. Koppen, E. Govarts, L. Bruckers, E. Van de Mierop, V. Nelen, A. Covaci, A.C. Dirtu, C. Thomsen, L.S. Haug, G. Becher, M. Mampaey, G. Schoeters, N. Van Larebeke, W. Baeyens, Chemosphere 89 (2012) 988
52. J. L. Domingo, Environ. Int. 40 (2012) 187



53. European Commission, Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 amending for the 30th time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the member states relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (perfluorooctane sulfonates). *Off. J. Eur. Commun.*, L 372/32, 27.12.06, 2006
54. E. Reis, A. Lodolo, S. Miertus, *Survey of Soil Remediation Technology*. Unido, Trieste, 2008.
55. Q. Huang, P.M. Huang, A. Violante, *Soil Mineral – Microbe – Organic Interactions*; Springer, 2008
56. D. Borrok, J.B. Fein, *Geochim. Cosmochim. Acta* 68 (2004) 3043
57. P. Nannipieri, J. Acher, M.T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, G. Renella, *Eur. J. Soil Sci.* 54 (2003) 655
58. C.J. Daughney, D.A. Fowle, D. Fortin, *Geochim. Cosmochim. Acta* 65 (2001) 1025
59. G. M. King, M. A. Garey, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4393
60. A. Kappler, M. Benz, B. Schink, A. Brune, *FEMS Microbiol. Ecol.* 47 (2004) 85
61. M. Pédrot, A. Le Boudec, M. Davranche, A. Dia, O. Henin, *J. Colloid. Interface. Sci.* 359 (2011) 75
62. J. Gescher, A. Kappler, *Microbial Metal Respiration*, Springer, 2013
63. K. M. DeAngelis, W. L. Silver, A. W. Thompson, K. K. Firestone, *Environ. Microbiol.* 12 (2010) 3137
64. S. Zhong, Y. Wu, J. Xu, *J. Environ. Sci.* 21 (2009) 1415
65. K.D. Welch, T.Z. Davis, S.D. Aust, *Arch. Biochem. Biophys.* 397 (2002) 360
66. H.J.H. Fenton, *J. Chem. Soc.* 65 (1896) 899
67. E.A. Perpetuo, C.B. Souza, C.A.O. Nascimento, *In Tech* (2011) 606
68. M. Gavrilescu, *Eng. Life Sci.* 4 (2004) 219
69. H.H. Tabak, P. Lens, E.D. van Hullebusch, W. Dejonghe, *Rev. Environ. Sci Biotechnol.* 4 (2005) 115
70. R.M. Maier, I.L. Pepper, C.P. Gerba, *Environmental Microbiology*, Second Edition, Academic Press, 2000

71. S. N. Groudev, P.S. Georgiev, I.I. Spasova, K. Komnitsas, *Hydrometallurgy* 59 (2001) 311
72. R. Turpeinen, Interactions between metals, microbes and plants-Bioremediation of arsenic and lead contaminated soils, Academic dissertation, Auditorium 2002.
73. G. M. Gadd, *Microbiology* 156 (2010) 609
74. <http://ul.netd.ac.za/bitstream/10386/139/2/Sekhula%20Thesis%20Introduction%20111.pdf>
75. D. Relić, D. Đorđević, S. Sakan, I. Anđelković, S. Miletić, J. Đuričić, J. Hazard. Mater. 186 (2011) 1893
76. S. Sakan, I. Gržetić, D. Đorđević, *Environ. Sci. Pollut. R.* 14 (2007) 229
77. ISO 10390, 2002. Soil Quality - Determination of pH, Geneva
78. ISO 11465, 1993. Soil quality - Determination of dry matter and water content on a mass basis, Geneva
79. R. Margesin, F. Schinner, *Manual for Soil Analysis –Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005
80. ISO 10693, 1995. Soil quality - Determination of carbonate content - Volumetric method, Geneva
81. B. Wilke, in *Manual for Soil Analysis-monitoring and Assessing Soil Bioremediation*, R. Margesin, F. Schinner, Eds., F. Springer-Verlag, Berlin, 2005, p. 47
82. M. Pansu, J. Gautheyrou, *Handbook of Soil Analysis-mineralogical, Organic and Inorganic Methods*, Springer-Verlag, Berlin, 2006
83. ISO 11274, 1998. Soil Quality – Determination of the water-retention characteristic – Laboratory methods. Geneva
84. V.P. Beškoski, G. Gojgić-Cvijović, J. Milić, M. Ilić, S. Miletić, T. Šolević, M.M. Vrvić, *Chemosphere* 83 (2011) 34
85. ISO 16703, 2004. Soil Quality – Determination of Content of Hydrocarbon in the Range C10 to C40 by Gas Chromatography, Geneva
86. DIN EN 14345, 2004. Characterization of Waste. Determination of Hydrocarbon Content by Gravimetry. DIN, Berlin
87. EPA Method 9071B (1998), n-Hexane extractable material (HEM) for sludge, sediment, and soil samples

88. ISO 5073, 1999. Brown coals and lignites – Determination of humic acids, Geneva
89. H. Rönkkömäki, R. Pöykiö, H. Nurmesniemi, K. Popov, E. Merisalu, T. Tuomi, I. Välimäki, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 5 (2008) 485
90. I. Spasojević, M. Mojović, D. Blagojević, S.D. Spasić, D.R. Jones, A. Nikolić-Kokić, M.B. Spasić, *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 80
91. I. Spasojevic, *Crit. Rev. Cl. Lab. Sci.* 48 (2011) 114
92. G. Gojgić-Cvijović, M.M. Vrvic, *Praktikum za mikrobiološku hemiju*, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2003
93. Anonymus, *Suve podloge "Torlak"-Katalog*, Torlak- Institut za imunologiju i virusologiju, Beograd, 2010
94. J. Miličić-Terzić, Y. Lopez –Vidal, M. M. Vrvic, S. Saval, *Water Sci. Technol.* 42 (2000) 403
95. J. Miličić-Terzić, Y. Lopez-Vidal, M.M. Vrvic, S. Saval, *Bioresource Technol.* 78 (2001) 47
96. C. Löser, H. Seidel, A. Zehnsdorf, U. Stottmeister, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49 (1998) 631
97. C. H. Collins, P. M. Lyne, J. M. Grange, J. O. Falkinham, *Microbiological Methods*, Arnold, London 2004
98. Anonymus, *API Technical Manual, Procedure manual*, Toronto medical laboratories/Mount Sinai Hospital Microbiology Department, Microbiology Department Policy & Procedure Manual, Toronto, 2005
99. C. M. O'Hara, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2005) 147
100. Službeni glasnik Republike Srbije, Pravilnik o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje i metodama njihovog ispitivanja., br. 23, 1994
101. Council Directive 86/278/EEC, on the Protection of the Environment, and in Particular of the soil, When Sewage Sludge is used in Agriculture Official Journal L 181, 1986, p 6
102. Dutch Standards-circular on Target Values and Intervention Values for Soil Remediation, Netherlands Government Gazette, No. 39, Hague, Netherlands, 2000

103. J. V. Forsyth, Y.M. Tsao, R.D. Bleam, in *Bioaugmentation for Site Remediation*, R.E. Hinchee, J. Fredrickson, B.C. Alleman, Eds., Battelle Press, Columbus, 1995, p. 1
104. E. Katsivela, E.R.B. Moore, D. Maroukli, C. Strömpl, D. Pieper, N. Kalogerakis, *Biodegradation* 16 (2005) 169
105. G. Gojgić-Cvijović, V.P. Beškoski, J. Milić, M. Ilić, T. Šolević, S. Miletić, I. Vučković, B. Potkonjak, B. Jovančičević, M. Radulović, D. Djordjević, D. Jakovljević, O. Martinov, S. Spasić, V. Matić, B. Nastasijević, M.M. Vrvić, in *Implementation of Remediation in Environmental Quality Improvement*, LJ. Tanasijevic, Ed., Serbian Chamber of Commerce Board of Environmental Protection and Sustainable Development, Belgrade, 2006, p 125
106. Mila V. Ilić, *Transformacije zagađivača naftnog tipa u procesu simulacije biodegradacije u laboratorijskim aerobnim uslovima*; Hemijski fakultet, Beograd (2011), 1-95
107. UNEP/UNCHS, 1999. *The Kosovo Conflict: Consequences for the Environment and Human Settlements, Final Report*.  
<<http://postconflict.unep.ch/publications/finalreport.pdf>> (accessed 26.12.12).
108. M. Tatzber, M. Stemmer, H. Spiegel, C. Katzlberger, G. Haberhauer, A. Mentler, J. *Plant Nutr. Soil Soc.* 170 (2007) 522
109. D.L. Rimmer, *Eur. J. Soil Sci.* 57 (2006) 91
110. J.P. Kehrler, *Toxicology* 149 (2000) 43
111. P.J. Häkkinen, A.M. Anesio, W. Granéli, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61 (2004) 1520
112. M. Cáp, L. Váchová, Z. Palková, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, Vol. 2012, ID 976753, 13 pages, doi:10.1155/2012/976753.
113. A. M. Anesio, W. Granéli, G. R. Aiken, D. J. Kieber, K. Mopper, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 6267

## BIOGRAFIJA AUTORA



**Srđan B. MILETIĆ** rođen je 02. 09. 1973. godine u Postojni (Slovenija). Diplomirao je biohemiju na Hemijskom fakultetu u Beogradu 1998. godine, specijalistički rad iz biohemije odbranio je 2000. godine, a magistrirao 2005. godine na istom fakultetu – Smer biohemija. U Centru za hemiju IHTM zaposlio se 2000. godine kao istraživač pripravnik. U zvanje istraživač saradnik izabran je 2005. godine.

Oblast interesovanja i naučno-istraživačkog rada je biogeotehnologija i primena mikroorganizama za bioremedijaciju životne sredine zagađenje naftom, naftnim derivatima i metalima.

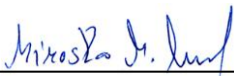
Autor i koautor je sedam naučnih radova sa ISI liste objavljenih u uglednim domaćim i inostranim časopisima, sedam tehničkih rešenja i više desetina saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu štampanih u celini i u izvodu.

---



## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Срђан Милетић  
Наслов рада „Испитивање загађених станишта као извора  
микроорганизама за биоремедиацију“  
Ментор проф. др Мирослав М. Врвић

Потписани 

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

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

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

У Београду, 12. novembar 2013

**Потпис докторанда**



## Изјава о коришћењу

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

„Испитивање загађених станишта као извора микроорганизама за биоремедиацију“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 12. novembar 2013





1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
  2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
  3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
  4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
  5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
  6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.
-