

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Milan D. Novaković

**UTICAJ BIOREMEDIJACIONIH USLOVA
NA BIODEGRADACIJU ZASIĆENIH I
AROMATIČNIH UGLJOVODONIKA U
ZAGAĐIVAČIMA NAFTNOG TIPA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Milan D. Novaković

**INFLUENCE OF BIOREMEDIATION
CONDITIONS ON BIODEGRADATION OF
SATURATED AND AROMATIC
HYDROCARBONS IN OIL-TYPE
POLLUTANTS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2013

Mentor:

Dr Branimir Jovančićević, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi Komisije:

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

Dr Mališa Antić, vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Gordana Gojgić-Cvijović, naučni savetnik
Centar za hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i
metalurgiju (IHTM)

Dr Tatjana Šolević-Knudsen, naučni saradnik
Centar za hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i
metalurgiju (IHTM)

Datum odbrane:

Ovaj rad urađen je na Katedri za primenjenu hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Temu za rad predložio je mentor prof. dr Branimir Jovančićević. Koristim priliku da mu se na tome, kao i na stručnim konsultacijama najljubaznije zahvalim.

Takođe se zahvaljujem prof. dr Miroslavu Vrvicu, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, dr Mališi Antiću, vanrednom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, dr Gordani Gojgić-Cvijović, naučnom savetniku u Centru za hemiju IHTM-a i dr Tanji Šolević-Knudsen, saradniku u Centru za hemiju IHTM-a, članovima Komisije, zbog velike pomoći koju su mi pružali tokom izrade teze.

Izraze zahvalnosti upućujem svim kolegama na Katedri za primenjenu hemiju Hemijskog fakulteta i u Centru za hemiju IHTM-a koji su mi pomagali i u toku izrade teze, ali i tokom celih doktorskih akademskih studija.

UTICAJ BIOREMEDIJACIONIH USLOVA NA BIODEGRADACIJU ZASIĆENIH I AROMATIČNIH UGLJOVODONIKA U ZAGAĐIVAČIMA NAFTNOG TIPRA

REZIME

Cilj ovog rada je bio da se na osnovu rezultata četiri različita eksperimenta objasni uticaj bioremedijacionih uslova na biodegradaciju zasićenih i aromatičnih ugljovodonika u zagađivačima naftnog tipa. Primenjen je ogled simulirane biodegradacije u laboratoriji, ogled *ex situ* bioremedijacije koji je izvođen u rafineriji nafte Pančevo od maja do novembra 2006. godine, ogled *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom koji je trajao od septembra 2009. do marta 2010. godine i ogled višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim derivatima koji je trajao od maja do jula 2012. godine.

U prve tri eksperimentalne studije za karakterizaciju supstrata korišćene su iste analitičke tehnike. Nakon ekstrakcije organske supstance, dobijeni ekstrakti su razdvojeni hromatografijom na koloni u četiri različite frakcije: frakciju zasićenih ugljovodonika, frakciju aromata, frakciju alkohola i frakciju masnih kiselina. U četvrtoj studiji nakon ekstrakcije dobijeni ekstrakti su razdvojeni hromatografijom na koloni u tri različite frakcije: frakciju zasićenih ugljovodonika, frakciju aromata i frakciju NSO jedinjenja. Pojedine frakcije u svim studijama su analizirane gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS).

Tokom oglada simulirane biodegradacije u laboratoriji ispitivan je bioremedijacioni potencijal aerobnih zimogenih mikroorganizma iz zemljišta. Korišćeni mikroorganizmi su pokazali najviši bioremedijacioni potencijal u razgradnji *n*-alkana i izoprenoida, visok biodegradacioni potencijal pri degradaciji fenantrena i metil-fenantrena i nizak pri degradaciji dimetil-fenatrena, sterana i terpana. Rezultati ovog oglada simulirane biodegradacije u laboratoriji originalni su rezultati doktorske teze dr Mile Ilić¹¹¹.

U drugoj studiji su izvođeni eksperimenti *ex situ* bioremedijacije kontaminiranog zemljišta na lokalitetu rafinerije nafte Pančevo. Analizom uzoraka su ustanovljene promene u sastavu naftnog zagađivača samo u poslednjoj fazi eksperimenta. Aktivnost mikroorganizma ogledala se u smanjenju teških komponenti nafte, čime je naftna zagađujuća supstanca dovedena u oblik koji se efikasnije može ukloniti iz zemljišta. Rezultati ovog oglada *ex situ* bioremedijacije originalni su rezultati doktorske teze dr Vladimira Beškog¹⁰⁵.

U trećoj studiji su izvođeni eksperimenti *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom. Deo „iskopanog“ zemljišta je odvojen u kontrolnu gomilu, koja je bila izložena prirodnim biodegradacionim procesima. Tokom biodegradacionog oglada uočena je preferencijalna i brža degradacija fenantrena u odnosu na metil supstituisane fenentrene.

U poslednjoj studiji su izvođeni ogledi višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim zagađivačem. Na kraju eksperimenta uočena je kompletna degradacija svih ispitivanih jedinjenja, *n*-alakana i izoprenoida, sterana, terpana, fenantrena, metil-fenantrena, dimetil-fenatrena i trimetil-fenatrena.

Rezultati izloženi u ovoj doktorskoj tezi deo su velikog istraživanja tokom kojeg su primenom četiri različita pristupa detaljno i sveobuhvatno analizirani različiti aspekti bioremedijacije životne sredine zagađene naftnim zagađujućim supstancama. Kao što je već naglašeno, rezultati oglada simulirane biodegradacije u laboratoriji i oglada *ex situ* bioremedijacije koji je izvođen u rafineriji nafte Pančevo od maja do novembra 2006 originalni su rezultati dve doktorske teze koje su odbranjene na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu ^{111, 105}.

U ovoj doktorskoj tezi originalno su izloženi rezultati eksperimenta *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom i oglada višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim zagađivačem. Ovi rezultati su prvo nezavisno prodiskutovani, a zatim i upoređeni sa prethodno publikovanim rezultatima celokupnog istraživanja ^{111, 105}.

Ključne reči: bioremedijacija, biodegradacija, naftne zagađujuće supstance, *n*-alkani, aromatični ugljovodonici, fenantren, metil-fenantreni

Naučna oblast: hemija životne sredine

Uža naučna oblast: bioremedijacija

UDK broj: 547.912

INFLUENCE OF BIOREMEDIATION CONDITIONS ON BIODEGRADATION OF SATURATED AND AROMATIC HYDROCARBONS IN OIL-TYPE POLLUTANTS

ABSTRACT

The aim of this paper is to explain influence of bioremediation conditions on the biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons of oil-type pollutants based on the results of four different experiments. Experiment of simulated biodegradation under laboratory conditions, experiment of *ex situ* bioremediation which was performed at the locality of the Oil Refinery Pančevo from May to November 2006, experiment of *ex situ* bioremediation of soil contaminated with heavy residual fuel oil which was performed during the period from September 2009 to March 2010 and experiment of multi stage *in situ* bioremediation of aquifer contaminated with petroleum derivatives which was performed from May to July 2012 were done.

In the first three experiments for substrate characterizations the same analytical procedure was used. After extraction of organic substance, extracts were separated by column chromatography on fraction of saturated hydrocarbons, aromatics, alcohols and fraction of fatty acids. In the fourth experiment obtained extracts after extractions were separated by column chromatography on fraction of saturated hydrocarbons, aromatics and NSO compounds. Individual fractions from all experiments were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

In the experiment of simulated biodegradation under laboratory conditions, bioremediation potential of the aerobic zymogenous microorganisms from soil for crude oil biodegradation was investigated. Microorganisms showed the highest bioremediation potential in degradation of *n*-alkanes and isoprenoids, a high potential was confirmed in the biodegradation of phenanthrene and methyl phenanthrenes and low potential was noted in degradation of dimethyl phenantrenes, steranes and triterpanes. The results of this experiment of simulated biodegradation under the laboratory conditions are original results of a doctoral thesis of Dr. Mila Ilić¹¹¹.

In the experiment of *ex situ* bioremediation at the locality of the Oil Refinery Pančevo, significant changes in the composition of the oil pollutant determined by analysis of the samples

occurred only during the last experiment phases. The activity of microorganisms was reflected in the decrease of the heavy compounds, whereby the oil pollutant was transformed to a form that could be removed more efficiently. The results of this experiment of *ex situ* bioremediation are original results of a doctoral thesis of Dr. Vladimir Beškoski¹⁰⁵.

In the third study, experiment of *ex situ* bioremediation of soil contaminated with heavy residual fuel oil was performed. Part of excavated soil was separated into a control pile, which was exposed to natural biodegradation processes. A preferential and accelerated degradation of phenanthrene versus methyl-phenanthrenes was observed.

In the last study, experiment of multi stage *in situ* bioremediation of aquifer contaminated with petroleum derivatives was performed. At the end of experiment complete degradation of all examined compounds, *n*-alkanes and isoprenoides, steranes, terpanes, phenanthrene, methyl-phenanthrenes, dimethyl-phenanthrenes and trimethyl-phenanthrenes was observed.

The results presented in this doctoral thesis are part of a large research in which by application of four different approaches thoroughly were analyzed various aspects of bioremediation of environment contaminated by oil pollutants. As already pointed out, the results of experiments of simulated biodegradation under laboratory conditions and *ex situ* bioremediation which was performed at the Oil Refinery Pančevo from May to November 2006, are the original results of two doctoral theses which were defended at the Faculty of Chemistry, University of Belgrade^{111, 105}.

This doctoral thesis originally presents the results of experiments of *ex situ* bioremediation of soil contaminated with heavy residual fuel oil and experiment of multistage *in situ* bioremediation of aquifers contaminated with petroleum pollutants. These results are firstly independently discussed, and then compared with previously published results of this whole research^{111, 105}.

Keywords: bioremediation, oil type pollutant, *n*-alkanes, aromatics, phenanthrene, methyl-phenanthrene isomers

Scientific field: environmental chemistry

Narrow scientific field: bioremediation

UDK number: 547.912

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Postanak nafte	3
2.2. Sastav nafte	6
2.2.1. Zasićeni ugljovodonici	7
2.2.2. Aromatični ugljovodonici	8
2.2.3. NSO-jednjenja	9
2.2.4. Asfalteni	10
2.3. Biološki markeri u naftama	10
2.4. Nafta kao najvažnije fosilno gorivo	14
2.5. Proizvodnja nafte u svetu	14
2.6. Nafta kao zagađivač životne sredine	15
2.7. Transfromacija nafte kao zagađivača u životnoj sredini	16
2.7.1. Migracija zagađivača naftnog tipa	18
2.7.2. Biodegradacija zagađivača naftnog tipa	19
2.7.3. Drugi procesi razlaganja (isparavanje, stvaranje emulzija sa vodama, fotooksidacija, adsorpcija na suspendovanim česticama, agregacija)	22
2.8. Uklanjanje zagađivača naftnog tipa iz životne sredine	24
2.8.1. Bioremedijacija	25
2.8.1.1. Bioremedijacija u laboratorijskim uslovima	28
2.8.1.2. <i>In situ</i> bioremedijacija	29
2.8.1.3. <i>Ex situ</i> bioremedijacija	31
2.8.2. Mikroorganizmi – razlagači ugljovodonika nafte	33
2.8.3. Podloge povoljne za razvoj mikroorganizama, razlagača nafte	42
2.8.4. Biostimulacioni faktori	45
3. NAŠI RADOVI	49
4. EKSPERIMENTALNI DEO I REZULTATI	52
4.1. Simulirana biodegradacija u laboratoriji	52
4.1.1. Primenjeni konzorcijumi mikroorganizama	52
4.1.2. Ispitivana nafta	52
4.1.3. Primenjeni uslovi biodegradacije	53
4.1.4. Određivanje grupnog sastava u izolovanim ekstraktima	53
4.1.5. Analiza izolovanih frakcija primenom instrumentalnih tehnika	55
4.1.6. Pregled dobijenih rezultata	56
4.2. <i>ex situ</i> Bioremedijacija – Rafinerija nafte Pančevo, maj-novembar 2006. godina	61
4.2.1. Lokalitet	61
4.2.2. Uslovi bioremedijacije	61
4.2.3. Primenjeni konzorcijum	62
4.2.4. Ekstrakcija organske supstance u uzorcima zagađenog zemljišta	62
4.2.5. Analiza izolovanih frakcija primenom instrumentalnih tehnika	63

4.2.6. Pregled dobijenih rezultata	63
4.3. <i>ex situ</i> Bioremedijacija – zemljište zagađeno mazutom, septembar 2009 – mart 2010. godina	65
4.3.1. Uzorak	65
4.3.2. Primenjeni uslovi	66
4.3.3. Primenjeni konzorcijum	66
4.3.4. Ekstrakcija organske supstance u uzorcima zagađenog zemljišta	66
4.3.5. Određivanje grupnog sastava u izolovanim ekstraktima	66
4.3.6. Analiza aromatične frakcije GC-MS tehnikom	67
4.3.7. Pregled dobijenih rezultata	67
4.4. Višestepena <i>in situ</i> bioremedijacija izdani kontaminirane naftnim derivatima	70
4.4.1. Uslovi bioremedijacije	71
4.4.2. Određivanje grupnog sastava u izolovanim ekstraktima	71
4.4.3. Analiza izolovanih frakcija primenom instrumentalnih tehnika	72
4.4.4. Pregled dobijenih rezultata	73
5. DISKUSIJA O REZULTATIMA	79
6. ZAKLJUČAK	86
7. LITERATURA	89

1. UVOD

Zagađivanje životne sredine narušava prirodno funkcionisanje ekosistema, a time i zdravlje ljudi i kvalitet života. Većina zagađenja je izazvana ljudskim aktivnostima i prateći je efekat rasta ljudske populacije i tehnološkog razvoja. Osnovni uzroci zagađivanja mogu se povezati s neprekidnim porastom broja ljudi na Zemlji i potrebom da se zbog toga stalno povećava korišćenje prirodnih resursa.

U novije doba nafta je postala jedan od najvažnijih energetske resursa. Moderna civilizacija danas u potpunosti zavisi od nafte i njenih derivata. Sirova nafta je smeša različitih ugljovodonika. Velika količine sirove nafte nalazi se u Zemljinoj kori. Preradom sirove nafte dobijaju se njeni derivati. Oni se koriste kao goriva i upotrebljavaju se kao osnovna sirovina u hemijskoj industriji. Do zagađivanja naftom i njenim derivatima može doći pri njenoj eksploataciji, odnosno pri vađenju iz Zemljine kore, pri preradi, njenom transportu, skladištenju i upotrebi. Prisustvo zagađivača naftnog tipa u sedimentima, površinskim i podzemnim vodama, predstavlja ozbiljnu opasnost po životnu sredinu. Kada naftni zagađivač dospe u životnu sredinu, on se može akumulirati ili rasprostirati kroz nju različitim putevima. Sve dok se nafta ne degraduje, kruži u raznim oblicima, pa je ispitivanje njene akumulacije i transformacija u prirodi od izuzetne važnosti.

Biodegradacija predstavlja prirodan proces kojim mikroorganizmi razlažu komponente nafte u manje toksične supstance. Bioremedijacija predstavlja optimizaciju biodegradacije. To se postiže na više različitih načina: dodavanjem mikroorganizma koji mogu da razlažu naftne zagađujuće supstance (inokulacija), dodavanjem supstanci koje stimulišu rast već prisutnih mikroorganizama koji razlažu naftu, ili modifikacijom uslova životne sredine kako bi se dobili optimalni uslovi za degradaciju nafte i njenih derivata i za stimulisanje rasta mikroorganizama. Bioremedijacija daje obećavajuće rezultate u rešavanju problema uklanjanja naftnog zagađivača. Međutim, optimizacija bioremedijacije zahteva i nova dodatna istraživanja.

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivan uticaj bioremedijacionih uslova na biodegradaciju zasićenih i aromatičnih ugljovodonika u zagađujućim supstancama naftnog tipa. Ova doktorska disertacija obuhvata četiri različite eksperimentalne studije: ogled simulirane

biodegradacije u laboratoriji, ogled *ex situ* bioremedijacije koji je izvođen u rafineriji nafte Pančevo od maja do novembra 2006. godine, ogled *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom koji je trajao od septembra 2009. do marta 2010. godine i ogled višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim zagađivačem. Rezultati oglada *ex situ* bioremedijacije originalni su rezultati doktorske teze Dr Vladimira Beškskog¹⁰⁵, dok su rezultati oglada simulirane biodegradacije u laboratoriji originalni rezultati doktorske teze Dr Mile Ilić¹¹¹.

U prve tri studije za karakterizaciju supstrata korišćen je identičan analitički postupak. Nakon razdvajanja na koloni, pojedine frakcije ekstrakta su dodatno analizirane gasno hromatografski-maseno spektrometrijski (GC-MS). Primenjeni pristupi dali su posebne zaključke. Ogled simulirane biodegradacije u laboratoriji je posmatrao promenu u sastavu *n*-alkana i izoprenoida, sterana i terpana, fenatrena, metil-fenatrena i dimetil-fenatrena tokom vremena. U ogledu *ex situ* bioremedijacije koji je izvođen u rafineriji nafte Pančevo od maja do novembra 2006. godine razmatrane su količine eluiranih frakcija dobijenih hromatografskim razdvajanjem. Ogled *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom koji je trajao od septembra 2009. do marta 2010. godine obuhvatio je promene u sastavu fenatrena, metil-fenatrena, dimetil-fenatrena i trimetil-fenatrena. U ogledu višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim zagađivačem uočena je potpuna degradacija svih ispitivanih jedinjenja. Zajednički cilj sve četiri studije je da se na osnovu dobijenih rezultata dođe do odgovora na pitanje kakav je uticaj različitih bioremedijacionih uslova na biodegradaciju zasićenih i aromatičnih ugljovodonika u zagađujućim supstancama naftnog tipa.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Postanak nafte

Dve različite teorije pokušale su da objasne postanak nafte. Te dve teorije se nazivaju biogenim i abiogenim modelima za postanak nafte. Iako se naučni dokazi mogu naći za oba modela, broj dokaza biogenog porekla nafte neuporedivo prevazilazi abiotičku teoriju. Tokom istorije, još od antičke Grčke bilo je pokušaja da se objasne poreklo i nastanak nafte. Andreas Libavius je u svom delu *Alhemija* iz 1597. tvrdio da je bitumen formiran iz smola antičkog drveća.¹ Njegovi tekstovi se danas smatraju začetcima biotičke teorije postanka nafte. Lomonosov je u svojoj knjizi *On the strata of the Earth* iz 1763. opisao ideju da nafta vodi poreklo od uglja i delova biljaka koji su bili izloženi transformacijama usled visokih podpovršinskih temperatura i pritisaka.² Engler je 1913. godine povezo termalne osobine u zemljištu i nafte, kada je zagrevanjem organske materije dobio ugljovodonike.³ Razvoj hemije, geologije i paleontologije u dvadesetom veku doprineo je razjašnjenju postanka nafte. Alfred Triebs je 1936. uspostavio vezu između hlorofila u živim organizmima i porfirina iz nafte.⁴ Oakwood je 1952. utvrdio da nafta, kao materija biološkog porekla, sadrži optički aktivna jedinjenja.⁵ Eglinton i Calvin su 1967. su pokazali da nafta sadrži različite biomarkere, osim porfirina, koji mogu biti povezani sa biološkim jedinjenjima iz kojih su nastali.⁶ Abelson je 1963. godine dokazao važnu ulogu kerogena u nastanku nafte,⁷ dok je Philippi 1965. otkrio da se prinos ugljovodonika iz izvorne stene povećava sa vremenom i temperaturom.⁸ Konačno, očevi moderne geohemije Tisot i Wellte su 1978. i 1984. zaokružili biotičku teoriju povezujući strukturno slična organska jedinjenja iz sedimenata i nafte sa njihovim prekursorima u živim organizmima.^{9,10}

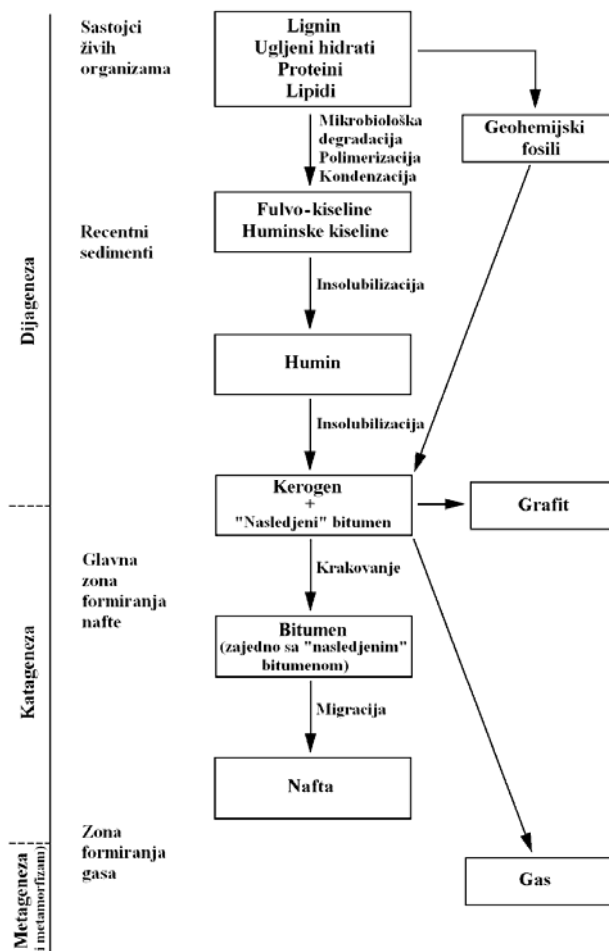
Abiotička teorija nastanka nafte je začeta u 19. veku. Marcelin-Pierre Berhelot je 1860. opisao dobijanje *n*-alkana razlaganjem čelika kiselinom.¹¹ Jedan od začetnika abiotičke teorije bio je i Mendeljejev koji je 1987. izneo teoriju o nastanku nafte putem hemijskih reakcija vode i metalnih karbida u velikim dubinama Zemljine kore kojom dolazi do nastanka acetilena koji može biti kondenzovan u više ugljovodonike.¹² Potisnuta u zapadnom svetu, abiotička teorija je nastavila svoj razvoj u uskim naučnim krugovima bivšeg SSSR-a. Kao dokaz izvodljivosti ove teorije uzet je Fischer Tropschov postupak kojim je moguće dobiti dugolančane ugljovodonike iz

neorganskih reaktanata na visokim temperaturama i pritiscima.¹³ Velikom zanemarivanju abiotičke teorije doprinela je i činjenica da nikada do danas nisu nađena veća komercijalna nalazišta nafte nastale abiogenim putem.¹⁴

Naftne izvorne stene su sedimentne stene koje sadrže dovoljnu količinu organske materije, a koje prilikom zagrevanja mogu da proizvedu i istisnu dovoljne količine nafte i/ili gasa. Sedimentne stene su formirane uz postojanje specifičnih uslova. Tri glavna faktora koja kontrolišu deponovanje organske supstance su produktivnost, razblaživanje i očuvanje. Biološka produktivnost određuje iznos organske supstance koja doprinosi nastanku sedimenta. Razblaživanje se odnosi na količinu neorganskih minerala koji se mešaju sa organskom materijom. Nakon deponovanja, organska supstanca mora biti očuvana kako bi kasnije mogla da proizvede ugljovodonike. Anoksični uslovi pospešuju očuvanje organske supstance i pospešuju deponovanje potencijalnih izvornih stena. Pretpostavlja se da se od ukupne organske supstance biosfere, pošto ona dospe u površinske delove geosfere, samo 0,01 - 0,1% zadrži u sedimentnim stenama. Preostali deo se vraća u biosferu.

Transformacija organske supstance koja se nalazi u sedimentnim stenama se odigrava u četiri faze koje se nazivaju dijageneza, katageneza, metageneza i metomorfizam. U ranoj dijagenezi najintenzivnija je mikrobiološka aktivnost. Ugljeni hidrati, proteini i lignin izumrlih organizama se na malim dubinama i pod blagim uslovima za koje nisu karakteristične povišene temperature i pritisci, razlažu uglavnom dejstvom mikroorganizama. Znatno manji deo organske supstance uspeva da izbegne hemijske promene i reciklovanje i ugrađuje se u sedimente. U kasnoj dijagenezi organska supstanca se polimerizuje i polikondenzuje u proizvode tipa fulvo i huminskih kiselina, a zatim i humina. Daljom insolubilizacijom, oslobađanjem ugljen-dioksida, vode, amonijaka i metana, nastaje kerogen. Nastanak kerogena označava kraj dijageneze. Kerogen predstavlja nerastvorni deo organske supstance sedimentnih stena. Osim kerogena, u sedimentnoj steni se nalazi i manja količina rastvornog dela. Rastvorni deo organske supstance sedimentnih stena naziva se „nasleđenim“ bitumenom. Njega čine ugljovodonici i neka druga lipidna jedinjenja, kao i supstance koje potiču od pigmenata (izoprenoidi, porfirini) ili drugih metabolita (steroidi, terpenoidi). Ova jedinjenja su u velikoj meri zadržala hemijsku strukturu jedinjenja iz živog sveta, obezbeđujući informacije o prekursorskom materijalu. Zbog toga se ona nazivaju molekulskim fosilima ili biomarkerima. Tokom vremena i usled prekrivanja novim sedimentima, organska supstanca dospeva na veće dubine, gde biva izložena višim

pritisćima i temperaturama, a i dejstvu mineralnih katalizatora. Dalje promene organske supstance se dešavaju u katagenezi. Katageneza se obično odigrava na dubinama većim od hiljadu metara, na temperaturama 50 – 150 °C i pritisćima 300 – 1700 bara. Pod navedenim uslovima dolazi do degradacije kerogena u proizvode koji se sastoje od manjih molekula, rastvornih u organskim rastvaračima koji se opštim imenom nazivaju bitumen. Tako stvoreni bitumen meša se sa nasleđenim bitumenom. Pri degradaciji kerogena postaje i znatna količina gasa. Nagomilavanjem bitumena u sedimentnim stenama stvaraju se uslovi za njegovu migraciju. Sedimentne stene u kojima se stvara, u kojima bi mogla da se stvori, ili u kojima se nekad stvorila za migraciju dovoljna količina bitumena nazivaju se izvornim stenama za naftu. Pod povoljnim uslovima bitumen napušta izvornu stenu i migrira do rezervoarskih stena gde se akumulira. Bitumen akumuliran u ovim stenama se naziva nafta. Uprošćena šema transformacije organske supstance predstavljena je na slici 1.



Slika 1. Uprošćena šema transformacije organske supstance.¹⁵

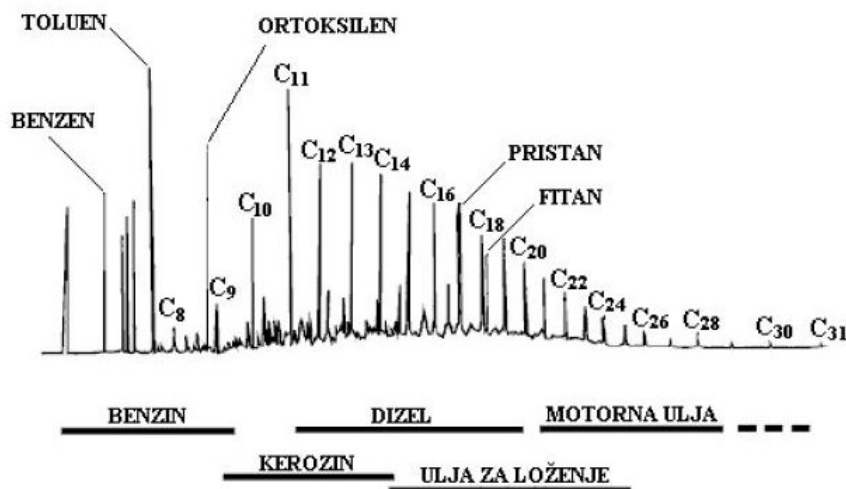
Temperatura predstavlja najznačajniji parametar u nastanku nafte. Na osnovu refleksije vitrinita je otkriveno da je temperatura od oko 200 °C, maksimalna temperatura do koje nafta može biti sačuvana a da ne bude transformisana u gas.¹³ Završne transformacije organske supstance se odvijaju u metaganezi i metaformizmu na dubinama i do deset hiljada metara, i u uslovima vrlo visokih temperatura i pritiska. Tada dolazi do završne degradacije kerogena i oslobađanja gasa, pretežno metana. Ostatak kerogena se pretvara u grafit, što predstavlja i kraj poslednje faze transformacije organske supstance geosfere.

2.2. Sastav nafte

Nafta (sirovi petroleum, zemno ulje, kameno ulje) je uljasta tečnost koja se nalazi u sedimentnim slojevima Zemljine kore. Mrke je boje, karakterističnog mirisa, ne meša se s vodom, gustine od 0,7 – 1,0 g/cm³. Iako nafta nastaje od izumrlih ostataka biljnog i životinjskog materijala hemijski sastav nafte nije isti u svim ležištima, jer uslovi prilikom nastajanja nisu bili isti, kao ni priroda materijala od koga je nafta nastala.

Nafta je smeša velikog broja ugljovodonika (90 – 95%). Ostatak čine 5 – 10 % jedinjenja azota, sumpora i kiseonika (NSO-jedinjenja) i elementi u tragovima. Zahvaljujući instrumentalnim metodama organske analize do danas je u nafti identifikovano više od 10.000 različitih jedinjenja. Prosečan elementarni sastav nafte iznosi: 80,4 - 80,7% C, 9,6 - 13,8% H, 0 - 3,0% O, 0 - 5,0% S, 0 - 2,0% N. Sumpor je treći po zastupljenosti element u sirovoj nafti. Njegov ukupan sadržaj je najčešće niži od 1%, mada ima izuzetaka. Generalno, što je veća specifična gustina nafte, veći je sadržaj sumpora u njoj. Kiseonik je u naftama obično zastupljen manje od 2% i uglavnom je prisutan kao deo težih frakcija. Azot je uvek prisutan u svim sirovim naftama, ali je njegov sadržaj uglavnom niži od 0,1%.¹⁴

Derivati nafte nastaju njenom preradom destilacijom, krakovanjem, katalitičkim reformingom, izomerizacijom i drugim procesima. Na slici 2. prikazan je gasni hromatogram koji pokazuje približne opsege najzastupljenijih ugljovodonika u pojedinim naftnim derivatima.



Slika 2. Gasni hromatogram koji pokazuje približne opsege najzastupljenijih ugljovodonika u pojedinim naftnim derivatima.¹⁷

Na osnovu različitih hemijskih osobina, iz nafte se mogu izolovati četiri klase jedinjenja:

1. Zasićeni ugljovodonici
2. Aromatični ugljovodonici
3. NSO jedinjenja
4. Asfalteni

2.2.1. Zasićeni ugljovodonici

Zasićeni ugljovodonici koji su prisutni u naftama su: *n*-alkani, izoprenoidi i cikloalkani. Ova jedinjenja su u naftnoj industriji poznata kao nafteni.

n-Alkani u većini uzoraka nafte predstavljaju najobilniju klasu organskih jedinjenja. Visoka koncentracija *n*-alkana u naftama objašnjava se njihovim prisustvom u lipidima biljaka i algi i njihovim katagenetskim postajanjem iz dugolančanih jedinjenja, kao što su masne kiseline i alkoholi. Sirove nafte mogu sadržati *n*-alkane u opsegu od *n*-C₈ do *n*-C₄₀. Obilnost i raspodela *n*-alkana u naftama određuje se gasnohromatografskom (GC) analizom.

Kao merilo dominacije neparnih ili parnih homologa među *n*-alkanima izolovanim iz sirovih nafte koristi se parametar Carbon Preference Index (CPI) ili Odd-Even Preferences (OEP). Na osnovu obilnosti *n*-alkana u sedimentnom organskom materijalu, na osnovu položaja maksimuma u njihovom homolognom nizu, kao i na osnovu vrednosti CPI parametra, moguće je

odrediti tip prekursorskog biološkog materijala, tip sredine u kojoj je staložen, stepen termičke maturanosti, a ponekad i stepen biodegradacije.

Izoprenoidi predstavljaju račvaste alkane. Najveći broj izoprenoida ima „glava-rep” izoprensko vezivanje i spada u regularne izoprenoide. Primeri ovakvih regularnih izoprenoida prisutnih u nafti su farnezan, pristan i fitan. Ovaj tip izoprenoida nastaje iz hlorofila *a* i hlorofila bakterija i izoprenoida dugog niza viših suvozemnih biljaka. Manji broj izoprenoida ima jedno „rep-rep” vezivanje u seriji „glava-rep” vezivanja i u ovu grupu spadaju skvalen i likopan. Ovaj tip izoprenoida ima uglavnom algalno poreklo. Neregularni izoprenoidi koji imaju jedno „glava-glava” vezivanje, spadaju u treću grupu. Ovaj tip izoprenoida identifikovan je u različitim vrstama bakterija. Najpoznatiji izoprenoidi su pristan i fitan. Oni nastaju od fitola izoprenoidnog alkohola hlorofila *a*. Kod biogenih izoprenoida pristan je mnogo češće zastupljeniji nego fitan što rezultuje visokim vrednostima pristan/fitan.

Od cikličnih alkana za geohemijska ispitivanja najbitniji su policiklični alkani tipa sterana i terpana. S obzirom na to da se policiklični alkani nalaze u naftama u veoma malim koncentracijama za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu neophodne su najsavremenije instrumentalne metode, pre svega, gasnrohromatografska-masenospektrometrijska (GC-MS) analiza. Policiklični alkani predstavljaju veoma važne biomarkere. Triterpani i sterani su jedinstveni za svaku naftu, te se njihova raspodela u GC-MS hromatografima može koristiti za identifikaciju porekla naftnog zagađivača. Otporniji su prema biodegradaciji od alifatičnih i aromatičnih jedinjenja i u toku rasprostiranja naftnog zagađivača u životnoj sredini, kao i u toku biodegradacije, njihova koncentracija raste u odnosu na lakše degradabilna jedinjenja.

2.2.2. Aromatični ugljovodonici

Aromatični ugljovodonici predstavljaju drugu grupu najzastupljenijih jedinjenja u naftama. Njihova koncentracija u naftama kreće se između 15 i 50%. U naftama su identifikovani mono-, di-, tri- i policiklični aromatični ugljovodonici (PAH). Među njima su najčešće najzastupljeniji monociklični aromatični ugljovodonici. Policiklični aromatični ugljovodonici koji sadrže u bočnom nizu alkil supstituente nazivaju se alkil areni. U naftama se javljaju u veoma malim količinama i jedinjenja koja, pored aromatičnog, mogu imati i više alifatičnih prstenova. Ova jedinjenja nazivaju se naftenoaromati. Procenjuje se da se u

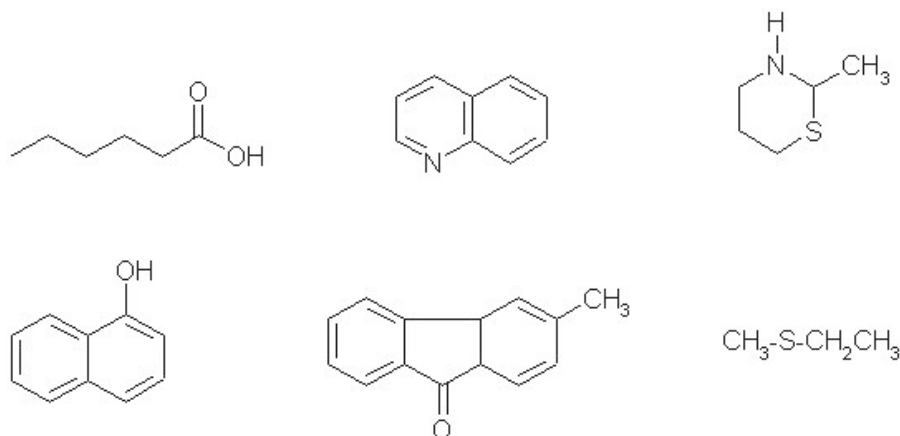
aromatičnoj frakciji jednog prosečnog uzorka nafte nalazi 67% benzenskih, 18% naftalenskih, 8% fenantrenskih, 3% hrizenskih i benzfluorenskih, 2% pirenskih i oko 1% antracenskih struktura.¹⁸ Laki aromatični ugljovodonici, kao što su benzen i toluen, ispitivani su u naftama, ali ova jedinjenja teško se analiziraju zbog svoje lake isparljivosti. U nekontaminiranoj životnoj sredini od aromatičnih jedinjenja mogu se naći biogeni PAH perilen i nesupstituisani PAH-ovi koji nastaju u toku rane dijageneze. Ova frakcija uključuje i jedinjenja manje molekulske mase sa sumporom.

2.2.3. NSO-jedinjenja

NSO - jedinjenja (smole) su polarna jedinjenja koja sadrže jedan ili više heteroatoma u strukturi. Iako se u ovoj grupi nalazi mnogo predstavnika koji se izuzetno razlikuju po svojoj hemijskoj strukturi, oni se u nafti nalaze u izuzetno malim količinama.

Na slici 3. prikazani su primeri struktura NSO-jedinjenja. Jedinjenja koja su najviše ispitivana iz ove grupe su: porfirini, više masne kiseline i alkoholi, alifatični i ciklični ketoni, sumporna alifatična i aromatična jedinjenja.

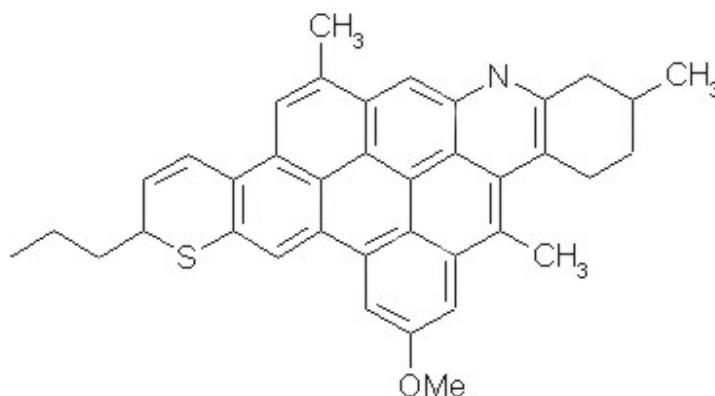
Smole su najpolarnija jedinjenja nađena u nafti, i usled toga interakcijom nafte i vode može doći do uklanjanja ovih jedinjenja.



Slika 3. Primeri struktura NSO-jedinjenja.

2.2.4. Asfalteni

Asfalteni su visokomolekularna jedinjenja koja mogu sadržati veći broj heteroatoma i generalno imaju aromatičnu strukturu. Na slici 4. prikazan je primer strukture asfaltena. Relativna molekulska masa ovih jedinjenja može biti i do 50.000. Asfalteni se u naftama javljaju u malim količinama, obično manje od 1%.



Slika 4. Primer strukture asfaltena.

2.3. Biološki markeri u naftama

Biološki markeri (biomarkeri, hemijski fosili) predstavljaju kompleksna jedinjenja koja se nalaze u nafti, bitumenima i sedimentima, a koja su po strukturi identična ili vrlo bliska jedinjenjima za koja se zna da postoje u biosferi. Da bi neko jedinjenje moglo da se koristi kao biološki marker, mora da ispunjava sledeće uslove: 1) da je u geološkim uslovima stabilno u toku dugog vremenskog perioda; 2) da je specifične strukture ugljenikovog skeleta koja se može okarakterisati u okviru poznatih biosintetičkih sekvenci; i 3) da se u znatnim količinama ne sintetizuje abiogenim putem. Biomarkerska jedinjenja se obično analiziraju pomoću gasne hromatografije i masene spektroskopije.

Biološki markeri se primenjuju u proceni porekla i maturanosti bitumena. Biomarkeri se koriste kao izvorni parametri zahvaljujući tome što su sačuvali ugljovodonični skelet kakav su imali u biosferi tokom dijagenskih i katagenetskih promena. Biomarkeri se koriste kao maturacioni parametri zahvaljujući tome što se tokom vremena ova jedinjenja transformišu u

termodinamički stabilnije izomere strukturnim i stereochemijskim promjenama. Odnos nastalih termodinamički stabilnijih izomera i manje stabilnih prekursora proporcionalan je stepenu maturanosti ukupne organske supstance. Najvažniji biomarkeri i biomarkerski parametri koji se koriste za procenu porekla nafte prikazanu su u tabeli 1.

Tabela 1. Biomarkeri i biomarkerski parametri koji se koriste za procenu porekla.

Procena porekla	Biološki parametri	Komentari i izvori
Marinske izvorne stene	24- <i>n</i> -propilholestani	Uobičajeno se nalaze u naftama koje potiču iz marinskih izvornih stena ¹⁹
	C ₄₂ -C ₄₆ ciklopentilalkani sa parnim/neparnim ugljeničnim nizom	^{20, 21}
Jezerske izvorne stene	Botriokokan	Prisustvo = jezerska sredina, odsustvo = nema zaključka ^{22, 23}
	b-Karotan	Prisustvo = jezerska sredina, odsustvo = nema zaključka ^{24, 25}
	Sterani/hopani	Nizak odnos u naftama koje potiču iz jezerskih izvornih stena ²⁶
	C ₂₆ /C ₂₅ triciklični terpani	>1 u mnogim naftama iz jezerskih škriljaca ²⁷
	Tetraciklični poliprenoidi	Prilična zastupljenost u naftama iz jezerskih sredina ²⁸
	C ₄₂ -C ₄₆ ciklopentilalkani sa parnim/neparnim ugljeničnim nizom	^{20, 21}
	Oleanani, lupani, tarakserani	Biomarkeri ukazuju na doprinos cvetnica ²⁹
	Bikadinani	Potiču od smola

Viši udeo biljaka u izvornim stenama		Dipterocarpaceae drveća ³⁰
	Reten, kadalen	Ukazuju na doprinos četinarara ³¹
	Tetraciklični diterpani	Ukazuju na doprinos četinarara ³¹
	C ₂₉ sterani	Visoka zastupljenost u odnosu na ukupne C ₂₇ -C ₂₉ sterane ^{32,33}
Ugljene izvorne stene	Pristan/Fitan	Veoma visok odnos , npr >3 ³⁴
	C ₃₁ homohopani	Velika zastupljenost u odnosu na ukupne C ₃₁ -C ₃₅ homohopane u pojedimin naftama iz ugljeva
Visko salinitetna taložna sredina	Gamaceran	Velika zastupljenost u odnosu na C ₃₁ hopane. Visoke vrednosti ukazuju na stratifikovani vodeni stub u toku taloženja. ³⁵
	Pristan/fitan	Veoma niske vrednosti, npr < 0,5 usled doprinosa fitana od strane halofilnih bakterija ^{36,37}
Anoksična taložna sredina izvornih stena	C ₃₅ homohopani	Velika zastupljenost u odnosu na ukupne hopane iz nafti koje potiču iz izvornih stena pod anoksičnim uslovima ³⁸
	Pristan/fitan	Odnos 1,0 ukazuje na anoksičnu sredinu, ali na ovaj odnos utiču i mnogi drugi faktori
	Izoreniretan i odgovarajuća jedinjenja (2,3,6 i 2,3,4 trimetilartil izoprenoidi)	Prisustvo ukazuje na fotičnu zonu prilikom taloženja izvorne stene, pošto su ova jedinjenja biomarkeri za zelene sumporne bakterije ^{39,40,41}
		Visok odnos ukazuje na

	V/(V+Ni) Porfirini	redukzione uslove ⁴²
	28,30 bisnorhopan	Visok odnos u pojedinim redukcionim sredinama
Karbonatne izvorne stene	30-norhopani	Visoka zastupljenost u naftama iz karbonatnih izvornih stena ^{37,43,44,}
	Diasterani/sterani	Nizak odnos u naftama iz karbonatnih izvornih stena ^{45,46}
	Dibenzotiofen/fenantren	>1 iz nafta poteklih iz karbonata sa visokom koncentracijom sumpora ³⁴
	2a-metilhopani	Visoka zastupljenost u naftama iz karbonatnih izvornih stena ⁴⁷

Relativna obilnost pojedinih biomarkera se menja sa maturisanošću izvorne stene. Zahvaljujući tome, a na osnovu analize migrirane nafte, različiti biomarkerski parametri su veoma korisni za utvrđivanje stepena maturisanosti izvorne stene. Primena biomarkerskih maturacionih parametra zasniva se na osnovu nekoliko procesa koji se javljaju tokom maturacije izvorne stene, a to su, pre svega, krakovanje većih molekula u manje, izomerizacija i aromatizacija. Najvažniji biomarkeri i biomarkerski parametri koji se koriste za procenu maturisanosti su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Najvažniji biomarkeri i biomarkerski parametri koji se koriste za procenu maturisanosti.

Frakcija	Biološki parametar	Promena tokom maturacije	Komentari
Zasićeni ugljovodonici	C ₂₉ Sterani [20S/(20S+20R)]	Povećanje	
	C ₂₉ sterani [$\alpha\beta\beta/(\alpha\beta\beta+\alpha\alpha\alpha)$]	Povećanje	
	Moretan/Hopan	Smanjenje	
	C ₃₁ Hopan [22S/(22S+22R)]	Povećanje	
	Ts/(Ts+Tm)	Povećanje	
	Triciklični terpani/sterani	Povećanje	Povećava se sa visokim stepenom biodegradacije
			Povećanje

	Diasterani/sterani		stepenom biodegradacije
Aromatični ugljovodonici	Monoaromatični steroidi (C ₂₁ +C ₂₂)/ [C ₂₁ +C ₂₂ +C ₂₇ +C ₂₈ +C ₂₉]	Povećanje	Ne menja se tokom biodegradacije
	Triaromatični steroidi (C ₂₀ +C ₂₁)/ [C ₂₀ +C ₂₁ +C ₂₆ +C ₂₇ +C ₂₈]	Povećanje	Ne menja se tokom biodegradacije
	Triaromatični/(monoaromatični + triaromatični steroidi)	Povećanje	Ne menja se tokom biodegradacije

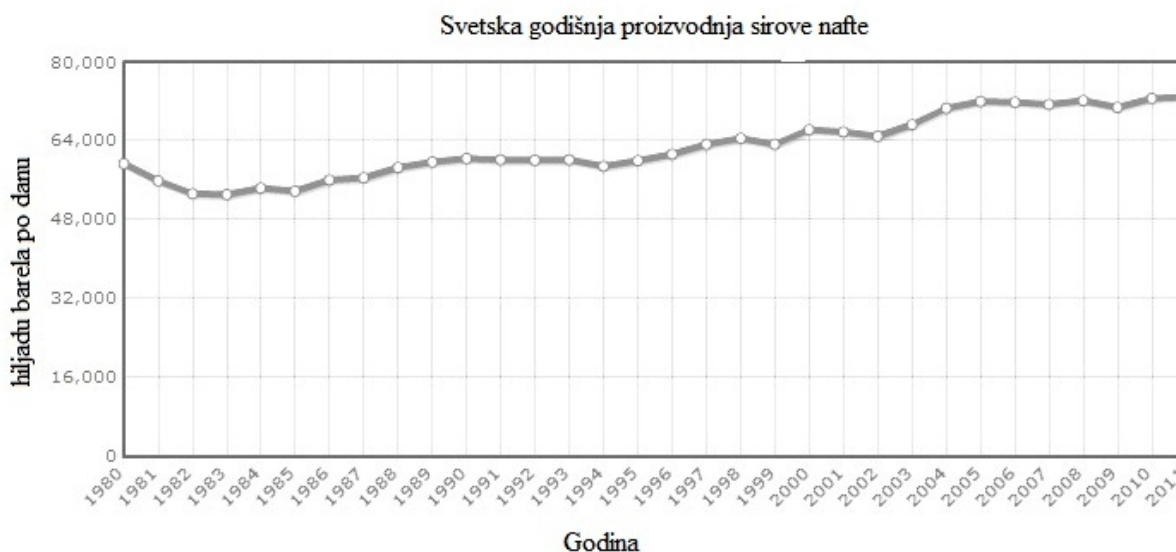
2.4. Nafta kao najvažnije fosilno gorivo

Fosilna goriva su goriva koja sadrže ugljovodonike i koja su nastala od fosilnih ostataka izumrlih organizama. Fosilna goriva su trenutno osnovni izvor energije na Zemlji. Po proceni američke agencije EIA (The U.S. Energy Information Administration) 2007. godine fosilna goriva su imala udela do 86,4% u potrošnji primarne energije u svetu, od čega je udeo nafte iznosio 36,0%, udeo uglja 27,4% i udeo prirodnog gasa 23,00%.⁴⁸ Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da je nafta najvažnije fosilno gorivo.

Preradom sirove nafte dobijaju se njeni derivati. Nafta i njeni derivati koriste se kao goriva i upotrebljavaju se kao jedna od osnovnih sirovina u hemijskoj industriji. Najveći deo nafte (oko 84%) koristi se za proizvodnju goriva koja se koriste kao izvori energije.⁴⁸

2.5. Proizvodnja nafte u svetu

Prve veće količine nafte dobio je Drejk u SAD 1859. godine bušenjem Zemljine kore. Od tada pa do današnjih dana, proizvodnja nafte kontinuirano raste. Budući da nafta predstavlja neobnovljivi resurs, postavlja se pitanje kada će doći do maksimalne proizvodnje nafte (naftni pik), posle čega će proizvodnja nafte u svetu početi da opada. Pretpostavljeno je da ja naftni pik dosegnut 2005. godine, ali s obzirom da je 2011. bila rekordna godina po proizvodnji nafte u svetu, ovo pitanje ostaje još otvoreno. Na slici 5. je prikazana svetska proizvodnja sirove nafte od 1980. do 2011. godine.



Slika 5. Svetska godišnja proizvodnja nafte u periodu 1980-2011. godina.⁴⁸

2.6. Nafta kao zagađivač životne sredine

Nafta je jedan od najvažnijih energetske resursa. Po proceni američke agencije EIA (The U.S. Energy Information Administration) dnevna proizvodnja nafte je u toku 2011. iznosila 87.042.440 barela.⁴⁸ Do zagađivanja naftom i njenim derivatima može doći pri njenoj eksploataciji, preradi, skladištenju i transportu. Od ukupne količine proizvedena nafte u toku jedne godine procenjeno je da oko 0,1% dospeva u životnu sredinu kao rezultat antropogenih aktivnosti.⁴⁹

Naftni zagađivač se u životnoj sredini, u zavisnosti od svojih hemijskih i fizičkih osobina, može akumulirati ili se putem vazduha i vode može transportovati na velika rastojanja i usled toga ispoljavati štetno delovanje na mestima koja su znatno udaljena od inicijalnih mesta izlivanja. Tokom boravka u životnoj sredini, osim fizičkih, naftni zagađivač može biti izložen i različitim hemijskim transformacijama čiji proizvodi često imaju znatno štetnije delovanje u odnosu na polazne molekule od koji su nastali. Zbog toga je praćenje mogućih puteva rasprostiranja naftnog zagađivača u životnoj sredini, kao i njegovih transformacija koje se tom prilikom dešavaju, od velikog značaja za hemiju životne sredine.

Toksični efekti naftnog zagađivača zavise, pre svega, od njegovog hemijskog sastava ali značajan uticaj imaju i osobine sredine u kojoj je došlo do izlivanja. Nafta izlivena u vodenoj

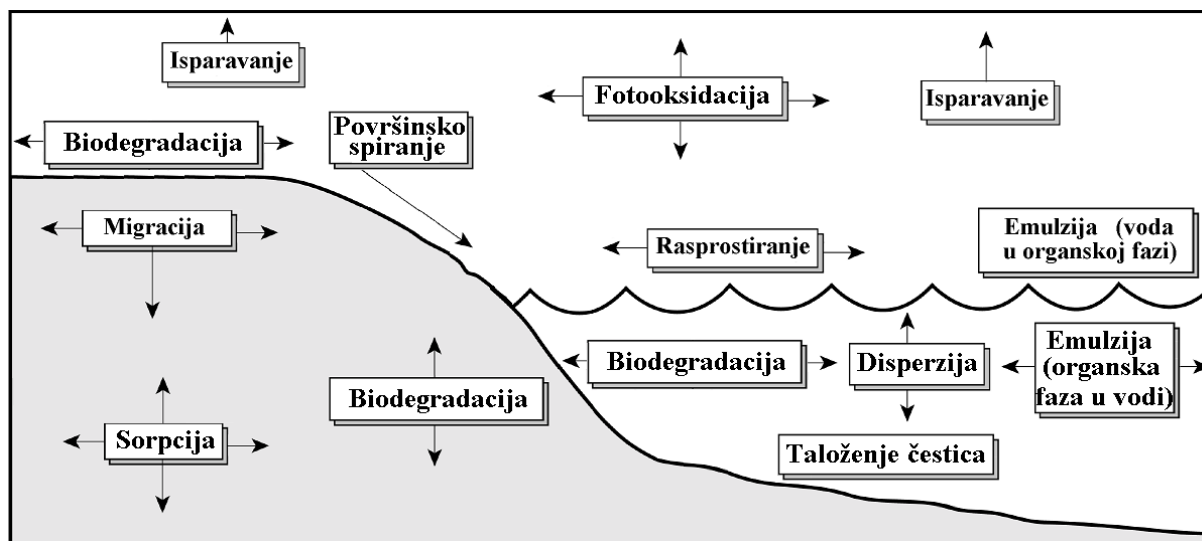
sredini ima veoma toksičan efekat na organizme koji žive u njenoj okolini, kao i na organizme koji žive i vodenoj sredini. Naftni zagađivač izliven po zemljištu pre svega inhibira rast biljaka i može smanjiti plodnost zemljišta koje se koristi za poljoprivredu. Migracijom kroz zemljište naftni zagađivač može dospeti do podzemnih voda. Korisnici podzemnih voda zagađenih naftnim zagađivačem imaju povećan rizik od nastanka različitih zdravstvenih problema.

Izlivena nafta utiče na više načina na životinje. Fizički kontakt nafte sa životinjama dovodi veoma brzo do njihovog uginuća. Toksična isparenja nafte mogu izazvati ozbiljna oštećena centralnog nervnog sistema životinja. Prosuta nafta uništava životna staništa pojedinih životinjskih vrsta i time direktno utiče na lanac ishrane. Benzen i njegovi supstituisani analozi iz aromatične frakcije nafte imaju izuzetno toksično, pre svega, kancerogeno dejstvo na žive organizme. Ingestija od strane živih bića uvodi pojedine molekule zagađivača u lanac ishrane koji usled biokoncentrovanja mogu imati toksičniji efekat od polaznog naftnog zagađivača. Kod životinja koje žive u sredini kontaminiranoj naftom, uočeni su i reproduktivni problemi koji se prenose na više generacija.

2.7. Transformacija nafte kao zagađivača u životnoj sredini

Kada naftni zagađivač dospe u životnu sredinu njegov sastav počinje trenutno da se menja usled različitih abiotičkih i biotičkih transformacija. Ove transformacije, nazvane „weathering“, značajno menjaju sastav naftnog zagađivača, a usled toga i njegove fizičke i hemijske osobine. Transformacije naftnog zagađivača u životnoj sredini prikazane su na slici 6.

Abiotičke transformacije predstavljaju procese u kojima se supstance u životnoj sredini modifikuju nebiološkim procesima. Abiotički gubici nastaju fizičkim odstranjivanjem pojedinih klasa jedinjenja iz naftnog zagađivača i nastaju, pre svega, procesima isparavanja, sorpcije, spiranja i rastvaranja. Abiotičke transformacije različite od fizičkih abiotičkih gubitaka uključuju reakcije kao što su hidroliza, fotodegradacija i oksido-redukcija, koje hemijskim procesima modifikuju ili potpuno razgrađuju kontaminante⁵⁰. U zavisnosti od vrste reakcije i od strukture pojedinog jedinjenja ovi procesi mogu dati proizvode koji mogu biti manje, a u nekim slučajevima i više toksični od samih polaznih molekula.^{17,51}



Slika 6. Transformacije zagađivača naftnog tipa u životnoj sredini.⁵²

Biotički procesi uključuju ingestiju od strane živih organizama i mikrobiološku degradaciju. U zemljištima, podzemnim i površinskim vodama biološka degradacija predstavlja najvažniji transformacioni proces. U odsustvu svetlosti i na pritiscima i temperaturama uobičajenim na Zemljinoj površini, hemijske degradacione reakcije su relativno nevažne u odnosu na biološke degradacione reakcije.

„Weathering“ procesi, takođe, zavise od tipa prosute nafte, njenih fizičkih osobina kao što je viskozitet, hemijskih osobina kao sadržaj voskova i asfaltena, količine prosute nafte, vremenskih uslova i lokacije gde je došlo do izlivanja. Primarni fizički procesi koji utiču na sudbinu prosute nafte su: rasprostiranje, isparavanje, dispergovanje, rastvaranje i emulgovanje. Ovi procesi dominiraju u prvih nekoliko dana do nekoliko nedelja nakon izlivanja.

Na sastav i sudbinu naftnog zagađivača dodatno utiču i sledeći dugotrajni procesi: biodegradacija, fotooksidacija i sedimentacija. Ovi procesi nisu značajni za početna predviđanja sudbine zagađivača, ali su ipak mnogo više značajni u kasnijim fazama „weathering“ procesa i obično određuju konačnu sudbinu naftnog zagađivača.

2.7.1. Migracija zagađivača naftnog tipa

Rastvorljivost organskih jedinjenja u vodi je među najznačajnijim fizičkim osobinama koje kontrolišu njihov transport i sudbinu u životnoj sredini. Rastvorljivost ugljovodonika se smanjuje s povećavanjem njihove mase. Aromatični ugljovodonici su rastvorljiviji od alifatičnih ugljovodonika sličnih masa. Alifatični ugljovodonici ravnog niza su rastvorljiviji od račvastih alifatičnih ugljovodonika. Ugljovodonici se bolje rastvaraju u vodi obogaćenom prirodnim organskim makromolekulima, kao što su fulvo i huminske kiese. ⁵³ S druge strane, rastvorne soli u vodi imaju suprotan efekat. ⁵⁴

Rasprostiranje nafte u marinskoj sredini zavisi od više faktora, a pre svega od temperature, vodenih struja, plimskih tokova i brzine vetra. Nakon izlivanja nafte u marinskoj sredini, nafta počinje da se rasprostire po morskoj površini kao naftna mrlja. Ovo rasprostiranje predstavlja horizontalno kretanje po vodenoj površini usled efekata gravitacije, inercije, trenja i površinskog napona, a brzina rasprostiranja zavisi od viskoziteta izlivena nafte. Nafte niskih viskoziteta se brže šire od nafti visokih viskoziteta i mogu brzo prekriti velike morske površine. Međutim, nakon nekoliko sati dolazi do razbijanja naftne mrlje usled vetra, talasa i turbulencije vode. Nakon toga, za rasprostiranje nafte u marinskoj sredini najznačajnija je advekcija, odnosno, kretanje naftnog zagađivača usled dejstva vetra i/ili podvodnih struja. ⁵⁵

Pri kontaminaciji zemljišta i sedimenata naftnim zagađivačem, njegova fizička raspodela određuje njegovu sudbinu u ovoj sredini. Bočno rasprostiranje povećava kontaminiranu sredinu i olakšava gubitak ugljovodonika isparavanjem i njihovo uklanjanje fotodegradacijom. Vertikalno kretanje kroz zemljište predstavlja jedan od najvažnijih procesa prilikom transformacije naftnog zagađivača u sedimentu. Vertikalno kretanje se odvija pod dejstvom gravitacionih i kapilarnih sila. Rastvaranje naftnog zagađivača u zemljištu je, pre svega, uslovljeno sadržajem vlage, odnosno količinom dostupne vode. Usled posledica isparavanja i rastvaranja, preostali naftni zagađivač postaje sve gušći i viskoziji. Proces koji dodatno usporava kretanje preostalog naftnog zagađivača jeste sorpcija. Komponente zemljišta s velikom specifičnom površinom, kao što su minerali glina i organske komponente zemljišta, imaju najveći adsorpcioni kapacitet ka ugljovodonicima. ^{56,57} Pošto je sorpcija ravnotežan proces, ona utiče na koncentraciju naftnog zagađivača u zemljištu, njegovo rasprostiranje i na njegovu mobilnost. Ako je količina naftnog zagađivača manja u odnosu na zapreminu slobodnih pora u zemljištu, on ostaje na tom mestu

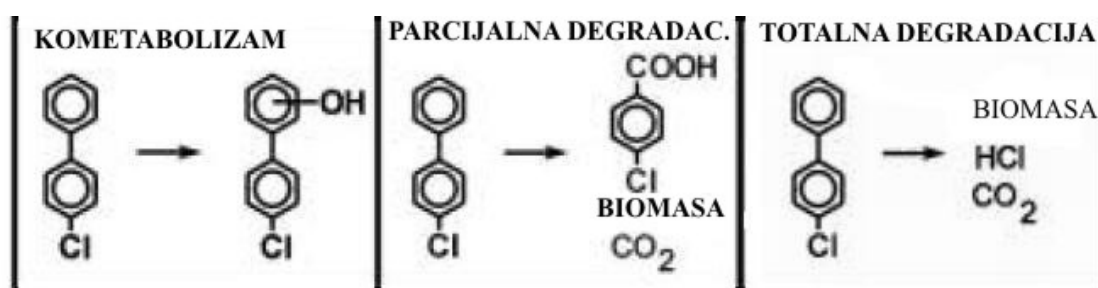
zarobljen usled sorpcije i delovanja kapilarnih sila, a ova pojava se naziva nepokretno ili rezidualno zasićenje.^{58,59,60} Ako to nije slučaj, tečni ugljovodonici se kreću kroz pore zemljišta, vođeni gravitacijom i mogu dospeti do nivoa podzemnih voda gde se akumuliraju i raspodeljuju kao posebna tečna faza koja se često označava kao nevodena tečna faza (non aqueous phase liquid - NAPL).⁵⁸ Razlike u sastavu između NAPL i naftnog zagađivača od kog NAPL nastaje su posledica isparavanja lako isparljivih komponenti i rastvaranja rastvorljivijih komponenti naftnog zagađivača. U zavisnosti od fizičkih osobina naftnog zagađivača postoje dva tipa NAPL, oni koji su manje gustine od vode (light non aqueous phase liquid ili LNAPL) i oni koji imaju gustinu veću od vode (dense non aqueous phase liquid ili DNAPL). LNAPL je zagađivač podzemnih voda, koji se nakon migracije kroz zemljište zaustavlja na površini podzemnih voda. S obzirom na to da je ovaj zagađivač lakši od vode on pluta po njenoj površini i najčešće se kreće u skladu sa brzinom i smerom tokova podzemnih voda. Nošen podzemnim vodom, LNAPL može preći velika rastojanja. Ovoj grupi jedinjenja pripada većina ugljovodonika iz nafte kao, na primer, benzen, toluen i ksilen. DNAPL je zagađivač koji je gušći od vode i koji se sa njom ne meša niti se u njoj rastvara. Kada se izlije u znatnim količinama ovaj zagađivač teži da tone ispod površine podzemne vode i zaustavlja se nailaskom na nepropusno tlo. Različite supstance i njihove smeše prilikom izlivanja formiraju DNAPL kao, na primer, halogenovani ugljovodonici, katran, kreozot, polihlorovani bifenili, živa i veoma teške nafte sa API gustinama većom od 10.

2.7.2. Biodegradacija zagađivača naftnog tipa

Biodegradacija predstavlja razgradnju organske supstance od strane mikroorganizama. Mnogi mikroorganizmi poseduju enzimsku sposobnost razgrađivanja ugljovodonika. Pod određenim uslovima neke vrste mikroorganizama mogu razoriti neka jedinjenja prisutna u naftama koristeći ih kao izvor energije. U nezagađenoj prirodnoj sredini ovi mikroorganizmi pre svega koriste ugljovodonike koji su prirodno proizvedeni od strane algi, biljaka i drugih živih organizama, ali i druge supstrate, kao što su ugljeni hidrati i proteini. Prema nekim procenama, ovi mikroorganizmi u životnoj sredini nezagađenoj naftnim zagađivačem obuhvataju manje od 1% ukupne mikrobiološke populacije.⁶⁰

Biodegradacija ne počinje odmah nakon što naftni zagađivač dospe u životnu sredinu. Naime, uočeno je da je mikroorganizmima potrebno određeno vreme (obično 2 do 4 sedmice) kako bi se umnožili i prilagodili da koriste specifična jedinjenja. Nakon toga, uočava se nagli porast mikroorganizama koji degraduju naftu. Njihov udeo može preći i 10% ukupne mikrobiološke populacije.⁶¹ Biodegradabilna jedinjenja nafte nakon početne rezistentnosti, usled aklimatizacije mikrobiološke populacije, brzo bivaju degradovana.

Najbrža i najkompletnija degradacija većine zagađivača odvija se pod aerobnim uslovima.⁶² Biodegradacija je bazirana na dva biološka procesa: rast i kometabolizam. U slučaju rasta, organsko jedinjenje se koristi kao izvor ugljenika i energije, odnosno kao supstrat rasta. Navedenom transformacijom od strane mikroorganizama, organsko jedinjenje može biti delimično ili potpuno degradovano. Delimičnom degradacijom se samo deo organskog molekula koristi kao supstrat rasta, dok se preostali, delimično modifikovani deo molekula oslobađa u životnu sredinu. Potpunom degradacijom (mineralizacijom) dolazi do konverzije organskog jedinjenja do ugljendioksida i vode, kao i ugradnje u ćelijsku biomasu. Kao rezultat ovog procesa povećava se broj mikroorganizama koji obavljaju biodegradaciju, kao i njihova biomasa. Na slici 7. prikazani su proizvodi kometabolizma, parcijalne i totalne degradacije halogenovanog bifenila.



Slika 7. Proizvodi kometabolizma, delimične degradacije i potpune degradacije halogenovanog bifenila.⁶³

Kometabolizam se definiše kao metabolizam organskog jedinjenja u prisustvu primarnog supstrata koji se koristi za rast mikroorganizma kao primarni izvor ugljenika i energije. Kometabolizmom se polazno organsko jedinjenje samo delimično modifikuje, nespecifičnim enzimskim reakcijama. Mikroorganizmi koji su odgovorni za kometaboličke transformacije

nemaju mogućnost da transformaciju organskog jedinjenja koriste za dobijanje energije ili biosintetičku namenu. Iako nema direktne koristi za organizme koji obavljaju kometaboličke transformacije, kometabolizam poboljšava efikasnost ukupne biodegradacije poboljšavajući biodegradabilnost transformisanih organskih jedinjenja. Proizvodi dobijeni kometabolizmom su obično na raspolaganju drugim vrstama mikroorganizama.

Neka jedinjenja koja se nalaze u nafti su biodegradabilna, dok su neka postojana tokom biodegradacije. Jedinjenja koja su lako biodegradabilna imaju jednostavne molekulske strukture koje su slične onima koje se nalaze u prirodi, rastvorna su u vodi, netoksična su i mogu se transformisati aerobnim metabolizmom.⁶⁴ Suprotno tome, jedinjenja koja su postojana tokom biodegradacije ili nisu biodegradabilna najčešće imaju vrlo složenu strukturu. Takve strukture se obično ne nalaze u prirodi, ne rastvaraju se u vodi, a ovakva jedinjenja mogu biti i toksična po mikroorganizme. Uočeno je da manji broj mikrobioloških vrsta može degradovati kompleksne strukture. Obično su to razgranate strukture i strukture s većim brojem kondenzovanih prstenova.

Kod biodegradacije nafte uočen je specifičan redosled biodegradabilnosti pojedinih klasa jedinjenja. *n*-Alkani predstavljaju najbiodegradabilnija jedinjenja u nafti, zato što mikroorganizmi lako prerađuju njihove duge linearne nizove. Takođe se lako razlažu i dugi alkil nizovi vezani za ciklična jedinjenja. Posle *n*-alkana i dugih alkil nizova počinje razlaganje jedinjenja s jednom metil račvom i više udaljenih račvi, a tek kasnije počinje razlaganje jedinjenja s više metil račvi kao što su izoprenoidi. Posle njih dolazi do degradacije policikličnih jedinjenja. Takođe je uočeno da se tokom biodegradacije rezistentnija jedinjenja konzumiraju pre celokupne potrošnje manje rezistentnih jedinjenja.⁶⁵ To znači da će, na primer, konzumacija sterana početi pre nego što se potroši celokupna količina *n*-alkana. Takođe, pokazano je da se čisti *n*-alkani degraduju u maloj količini ako nisu grupisani da zajedno obezbede mikroorganizmima smešu ugljeničnih lanaca različite dužine. Bakterijama je potrebno više od jednog čistog *n*-alkana za njihov respiratorni proces.⁶⁶

Tokom biodegradacije alkana dolazi do njihove oksidacije u karboksilne kiseline, koje se kasnije degraduju beta oksidacijom. Aromatični ugljovodonici se teže biodegraduju od alkana. Aromatični ugljovodonici se najčešće hidroksiluju do diola. Benzenov aromatični prsten se prevodi do katehola koji se naknadno degraduje. Zanimljivo je da se razlikuje stereohemija diola kao intermedijera koji su nastali dejstvom bakterija i gljivica. Bakterijski enzimi oksiduju benzenov prsten do *cis*-diola, a gljivični do *trans*-diola. Toksikološkim studijama utvrđeno je da

su trans-dioli potencijalni kancerogeni, a cis-dioli ne pokazuju nikakvu biološku aktivnost. Bakterije su najdominantniji degradatori aromatičnih ugljovodonika u marinskoj sredini i imaju veliku ulogu u njenoj detoksifikaciji s obzirom na to da uklanjaju kancerogena jedinjenja. U klasi policikličnih aromatičnih jedinjenja, oni sa dva ili tri kondenzovana prstena (naftalen, fenentren, antracen) najlakše podležu biodegradaciji. Njihovi alkil homolozi se teže biodegradiju dok se za policiklična aromatična jedinjenja sa više od 4 kondenzovana prstena uzima da su postojana tokom biodegradacije. Iako je uočeno da neke vrste gljivica mogu da vrše blagu biodegradaciju asfaltena, asfalteni i NSO jedinjenja se smatraju nebiodegradabilnim u životnoj sredini.⁶⁷

Konačan efekat biodegradacije nafte predstavlja uklanjanje većine jedinjenja koja su prisutna u nafti. Biodegradacija ugljovodonika proizvodi netoksične proizvode, kao što su: ugljendioksid, voda i ćelijska biomasa mikroorganizama koji su razlagali ugljovodonike. S obzirom na to da mikroorganizmi ne mogu izvršiti razlaganje kompleksnih struktura, tokom biodegradacije dolazi do povećanja rezidualne smeše ka daljoj biodegradaciji. Sirove nafte se nikad ne degraduju u potpunosti, već uvek ostaje ostatak koji sadrži znatan deo jako razgranatih alifatičnih jedinjenja, policikličnih aromatičnih jedinjenja (PAH-ova) s velikim brojem kondenzovanih prstenova i asfaltena.⁵⁰ Toksičnost zaostale smeše je vrlo niska i ona ostaje kao inertni zagađivač u životnoj sredini bez toksičnih efekata.⁶¹

2.7.3. Drugi procesi razlaganja (isparavanje, stvaranje emulzija sa vodama, fotooksidacija, adsorpcija na suspendovanim česticama, agregacija)

Isparavanje je najznačajniji proces u prvim danima nakon izlivanja naftnog zagađivača. Step en isparavanja zavisi od spoljašnjih uslova, pre svega, temperature i brzine vetra, kao i sastava naftnog zagađivača. Što je veći udeo komponenti sa nižim tačkama ključanja u naftnom zagađivaču, biće veći step en isparavanja. U umerenim vremenskim uslovima komponente nafte sa tačkama ključanja ispod 200 °C teže da ispare u vremenskom periodu od 24 sata. Rasprostiranje nafte, takođe, ima uticaj na isparavanje. Što se naftni zagađivač raspodelio po većoj površini, lakše komponente će brže ispariti. Preostali naftni zagađivač nakon isparavanja ima znatno povećanu gustinu i viskozitet.

Dispergovanje predstavlja uklanjanje naftnog zagađivača sa vodene površine u vodeni stub. Step en dispergovanja zavisi od energije talasa. U morskoj sredini dispergovanje može biti dominantan proces, tako da se većina naftnog zagađivača uklanja sa vodene površine u toku od

nekoliko časova. Što je naftni zagađivač viskozniji, dispergovanje je sporije. U vodenom stubu dispergovana nafta je prisutna u vidu sićušnih kapljica. Naftni zagađivač suspendovan u vodenom stubu ima znatno veću površinu nego pre dispergovanja što podstiče pojavu ostalih prirodnih procesa kao što su biodegradacija, rastvaranje i sedimentacija.

Rastvaranje je odgovorno za gubitak manjih količina naftnog zagađivača. Pretpostavlja se da se samo 2 do 5% od ukupnog naftnog zagađivača uklanja prirodnim rastvaranjem.⁶⁸ Nizak procenat uklanjanja je posledica toga što će iste komponente naftnog zagađivača koje mogu biti rastvorene pre rastvaranja ispariti. Isparavanje i rastvaranje su konkurentski procesi, ali je isparavanje brže od 10 do 1.000 puta od rastvaranja.⁶⁹ Čak i komponente koje se rastvore, mogu biti uklonjene dodatnim isparavanjem⁷⁰ ili drugim procesima, kao što su biodegradacija ili fotooksidacija.

Emulgovanje sirove nafte predstavlja proces gde kapljice vode bivaju suspendovane u nafti. Ovim procesom nastaju emulzije vode u organskoj fazi. Usled formiranja ovakvih emulzija, zapremina naftnog zagađivača se povećava između tri i pet puta. To čini mehaničko uklanjanje emulzija sa vodene površine izuzetno teškim i usporava ostale procese, kao što su mikrobiloška degradacija i sedimentacija. Sirove nafte sa visokim sadržajem asfaltena (većim od 0,5%) teže da grade stabilne emulzije koje mogu trajati mesecima nakon izlivanja naftnog zagađivača, dok sirove nafte sa niskim sadržajem asfaltena više teže da grade disperzije nego da formiraju emulzije.^{71,72}

Sedimentacija predstavlja proces kojim se naftni zagađivač inkorporira u sediment. Naftni zagađivač pluta po površini vode sve dok od nje ima manju gustinu. Vrlo je malo teških nafti ili teških nafti kojima je gustina povećana usled weathering procesa tako da imaju veću gustinu od okolne vode i mogu direktno da tonu. Obično se nafta transportuje u sediment drugačijim mehanizmom, adsorpcijom na suspendovanim česticama. Obično je i najmanja interakcija naftnog zagađivača sa vodene površine i suspendovanih čestica uzrok sedimentacije, zbog velikog afiniteta naftnog zagađivača da se adsorbuje na suspendovanim česticama. Suspendovane čestice najčešće čine smeše organske supstance i bakterija, gline, kao i čestica sedimenata. Sedimentacija se, dodatno, može javiti ingestijom i ekskrecijom naftnog zagađivača od strane planktona. Takođe, sedimentacija se može javiti i interakcijom između dispergovane nafte i suspendovanih čestica sedimenata. Sedimentacija se može javiti i mešanjem čestica peska i drugih sedimenata sa naftnim zagađivačem koji je izbačen na obalu i njihovim ponovnim

povlačenjem u more dejstvom talasa. Sedimentacija je najizraženija u plitkim vodama, gde je i koncentracija suspendovanih čestica najveća. Sedimentacija efikasno uklanja naftni zagađivač od dejstva ostalih weathering procesa, uključujući i biodegradaciju.

Fotooksidacija predstavlja proces transformacije naftnog zagađivača dejstvom sunčeve svetlosti i kiseonika iz vazduha. Fotooksidacija predstavlja marginalan proces u odnosu na ukupnu količinu transformisanog naftnog zagađivača, ali proizvodi nastali fotooksidacijom mogu biti toksičniji od polaznih molekula⁷³. Čak i pri veoma izraženom sunčevom svetlošću film naftnog zagađivača se razlaže veoma sporo i ne više od 0,1% dnevno. Alifatične i aromatične frakcije naftnog zagađivača se fotohemijski oksiduju u polarnije aldehide, ketone, karboksilne kiseline i estre. S obzirom da fotooksidacijom nastaju proizvodi koji se mogu rastvoriti u vodenom stubu, fotooksidacija ima veliku ulogu u solubilizaciji naftnog zagađivača. Takođe, fotooksidacija može rezultovati i nastajanjem visokomolekulranih jedinjenja nastalih putem kondenzacije peroksidnih intermedijera ili oksidacijom nerastvornih jedinjenja prisutnih u naftnom zagađivaču. Ovaj proces je poznat i pod imenom formiranje katrana. Formiranje katrana je prouzrokovano oksidacijom gustih slojeva naftnog zagađivača viskog viskoziteta ili njegovih emulzija tipa voda u organskoj fazi. Ovim procesom nastaju takozvane grudve katrana, koje se sastoje od spoljašnjeg zaštitnog sloja koga čine viskomolekularna jedinjenja koji okružuje unutrašnjost u kojoj se nalazi naftni zagađivač transformisan weathering procesima. Grudve katrana predstavljaju veliki ekološki problem, jer mogu postojati veoma dugo u marinskoj sredini. Grudve katrana mogu biti transportovane na ogromna rastojanja od mesta izlivanja naftnog zagađivača i mogu biti nanete na obale ili na brodske rute.

2.8. Uklanjanje zagađivača naftnog tipa iz životne sredine

Prirodni oporavak je proces koji omogućava da se naftni zagađivač ukloni i degradira prirodnim putem, bez ikakvih dodatnih intervencija. Za mnoga naftna izlivanja je ekonomski isplativije ostaviti kontaminirano područje da se prirodno oporavi, nego da se pokuša neka intervencija. Primeri takvih slučajeva su kontaminirana područja koja se nalaze na udaljenim i nedostupnim lokacijama na kojima je velika brzina uklanjanja naftnog zagađivača prirodnim uklanjanjem, ili izlivanja na osetljivim mestima gde akcije uklanjanja naftnog zagađivača mogu izazvati više štete nego koristi. U slučajevima gde se prirodni oporavak koristi kao jedina metoda

uklanjanja naftnog zagađivača, monitoring program je neophodan kako bi se procenio učinak prirodnog uklanjanja. Glavni procesi koji rezultuju uklanjanju naftnog zagađivača prirodnim uklanjanjem su isparavanje, fotooksidacija i biodegradacija.

Remedijacija predstavlja korektivnu akciju sa ciljem da se kontaminirano područje očisti od zagađujućih supstanci ili da se zagađenje smanji na prihvatljivi nivo. Remedijacija se bavi uklanjanjem zagađenja ili zagađivača iz zemljišta, podzemnih voda, sedimenta ili površinskih voda radi opšte zaštite ljudskog zdravlja i životne sredine. Remedijacija je uslovljena nizom regulatornih zahteva. U slučajevima gde zakonodavni standardi ne postoje ili nisu obavezujući, remedijacija je zasnovana na procenama radi zaštite ljudskog zdravlja i životne sredine.

Remedijacione tehnologije za uklanjanje naftnog zagađivača se dele na fizičke, termalne, hemijske i biološke, u zavisnosti od procesa koji se koriste prilikom odstranjivanja. Ove podele nisu striktno i u naučnoj literaturi se mogu naći različite klasifikacije remedijacionih tehnologija. Uobičajene fizičke metode obuhvataju procese kojima se zagađivač fizički uklanja iz životne sredine (kao na primer, ekstrakcija, adsorpcija/absorpcija, fizičko razdvajanje faza itd). Termalne metode obuhvataju isparavanje i termalnu degradaciju kontaminanta. Hemijske metode obuhvataju procese oksidacije ili redukcije kontaminanta, dok biološke metode obuhvataju mikrobilošku razgradnju i fitoremedijaciju. Remedijacione tehnologije su predmet konstantnog razvoja i usavršavanja. Remedijacione tehnologije su prilagođene sredini u kojoj je došlo do kontaminacije, tako da, na primer, imamo posebno razvijene remedijacione tehnologije za tretman kontaminiranog zemljišta i za tretman kontaminiranih podzemnih voda. Remedijacione tehnologije za uklanjanje naftnog zagađivača iz zemljišta se uobičajeno dele na abiotičke (fizičke, hemijske i termičke) i biotičke (bioremedijacija u širem smislu). Ove metode se mogu direktno primeniti na mestu zagađenja (*in situ*) ili izvan mesta zagađenja (*ex situ*). Prilikom *ex situ* postupka neophodno je kontaminirano zemljište iskopati i transportovati ga do mesta obrade.

2.8.1. Bioremedijacija

Biološke metode za uklanjanje naftnih zagađivača iz životne sredine koriste se dugi niz godina u svetu. Vrednost globalnog tržišta za remedijaciju opasnog otpada u 2006. godini iznosila je oko 11,7 milijardi dolara, dok je procena za 2011. godinu iznosila 16,6 milijardi dolara. Udeo bioloških metoda na ovom tržištu je oko 10%.⁷⁴ U tretmanu zagađenja od naftnog

zagađivača, bioremedijaciji pripada oko 25% od svih remedijacionih postupka.^{75,76,77,78} Bioremedijacija je, pre svega, ekonomski veoma isplativa s obzirom na to da je dosta jeftinija i efikasnija od abiotičkih metoda uklanjanja naftnog zagađivača. Kod bioremedijacije se kao biološki agensi koriste mikroorganizmi ili biljke (fitoremedijacija). Bioremedijacija je zasnovana na prirodnom postupku - biodegradaciji. Za razliku od biodegradacije koja je prirodni postupak, bioremedijacija predstavlja optimizovanu biodegradaciju. Prilikom bioremedijacije prirodni procesi biodegradacije se znatno ubrzavaju, pre svega, aeracijom (dodatkom kiseonika), biostimulacijom (dodatkom hranljivih supstanci) i bioaugmentacijom (dodatkom mikroorganizama). Kontrola i optimizacija bioremedijacionih procesa obuhvata mnogo različitih faktora. Ti faktori obuhvataju: prisustvo mikrobiološke populacije sposobne da degraduje zagađujuće supstance, dostupnost zagađujuće supstance mikrobiološkoj populaciji i faktore životne sredine (vrsta zemljišta, temperatura, pH, prisustvo kiseonika ili drugih elektron akceptora i nutrijenti).

Pojedini sastojci naftnog zagađivača se razlikuju po biodegradabilnosti. Neka jedinjenja se lako degraduju, neka jedinjenja su otporna, dok neka jedinjenja nisu biorazgradiva. Biodegradacija različitih jedinjenja sastojaka naftnog zagađivača se dešava istovremeno, ali različitom brzinom zato što različite vrste mikroorganizama preferiraju određena jedinjenja. To dovodi do sukcesivnog nestanka pojedinih komponenti naftnog zagađivača tokom vremena.

Mikroorganizmi proizvode enzime u prisustvu izvora ugljenika, koji vrše degradaciju. Mnogi različiti enzimi i metabolički putevi učestvuju u degradaciji ugljovodonika koji su sastojci naftnog zagađivača. Pojedini mikroorganizmi imaju sposobnost da degraduju samo određene sastojke naftnog zagađivača, dok mešane mikrobiološke zajednice omogućavaju veći stepen degradacije. Mešane mikrobiološke kulture imaju prednost zbog šireg degradacionog potencijala, sinergizma i mogućnosti kometabolizma. Nedostatak odgovarajućih degradacionih enzima prisutnih mikroorganizama može predstavljati barijeru za degradaciju ugljovodonika, sastojaka naftnog zagađivača.

Bioaugmentacija predstavlja dodavanje indogenih sojeva mikroorganizama ili genetski modifikovanih mikroorganizama radi tretiranja kontaminiranog zemljišta. Bioaugmentacija se primenjuje u slučaju da je u kontaminiranom zemljištu uočen veoma mali broj mikroorganizama ili ukoliko prisutni mikroorganizmi ne poseduju metaboličke mogućnosti da izvode remedijacione procese. Mikroorganizmi koji se upotrebljavaju za bioaugmentaciju se mogu

izolovati sa mesta kontaminacije ili se mogu komercijalno nabaviti. Genetski modifikovani organizmi su uglavnom dizajnirani za razgradnju teško degradabilnih jedinjenja. Upotreba genetski modifikovanih organizama je do danas ograničena samo na ogledne bioremedijacije u laboratorijskim uslovima. Bioaugmentacija se do sada pokazala kao delimično uspešna tehnika. Iako su u mnogim naučnim radovima pokazani pozitivni efekti bioaugmentacije, u nekim radovima se ova tehnika pokazala kao neuspešna.^{79,80} U navedenim radovima je uočen pad broja egzogenih mikroorganizama odmah nakon njihove aplikacije na kontaminiranom zemljištu. To je objašnjeno mnogobrojnim razlozima. Odmah po aplikaciji, egzogeni mikroorganizmi su izloženi kompeticiji sa prirodno prisutnim mikroorganizmima, anagonizmu i predatorstvu. Pored interakcije sa ostalim mikroorganizmima, sposobnost preživljavanja egzogenih mikroorganizama zavisi i od faktora životne sredine, pre svega fluktuacije u temperaturi, sadržaju vode i pH, dostupnosti kontaminanta i hranljivih materija.

Radi efikasnosti bioaugmentacije često se koriste mikroorganizmi iz zemljišta koje je kontaminirano naftnim zagađivačem. Najčešće se priprema mešana kultura, koja se umnožava i kao aktivna biomasa se aplikuje na kontaminiranom zemljištu. Ovakav postupak se naziva autohtona bioaugmentacija ili reinokulacija.⁸¹

Kao prednosti bioremedijacije navodi se sledeće.⁸²

1. Bioremedijacija je prirodan proces i zato je prihvaćena od strane javnosti za tretman kontaminiranog zemljišta. Mikroorganizmi koji mogu da degraduju kontaminant rastu u broju, kad je kontaminant prisutan. Nakon što je kontaminant degradovan mikrobiološka populacija koja je vršila degradovanje se smanjuje. Ostatak nakon bioremedijacije čine bezopasni proizvodi, voda, ugljendioksid i ćelijska masa.
2. Teorijski, bioremedijacija se koristi za kompletnu degradaciju različitih kontaminanata. Mnoga jedinjenja koja se smatraju veoma opasnim po životnu sredinu mogu biti transformisana do bezopasnih proizvoda.
3. Kompletna degradacija željenih kontaminanata je moguća, umesto transfera kontaminanta iz jedne u drugu sredinu.
4. Bioremedijacija se može izvoditi i direktno na mestu kontaminacije.
5. Bioremedijacija se pokazala kao dosta jeftinija u odnosu na druge remedijacione tehnologije.

Nedostatci bioremedijacije su sledeći.⁸²

1. Bioremedijacija je limitirana onim jedinjenjima koja su biorazgradiva. Nisu sva jedinjenja podložna brzom i potpunoj razgradnji.
2. Postoji izvesna zabrinutost javnosti da bi pojedini proizvodi bioremedijacije mogli biti znatno toksičniji od polaznih jedinjenja.
3. Biološki sistemi su veoma specifični. Glavni faktori za uspešnu bioremedijaciju obuhvataju prisustvo metabolički sposobne mikrobiološke populacije, povoljnih uslova za rast mikroorganizma i odgovarajuću količinu hranljivih materija i kontaminanata.
4. Veoma je teško izvršiti ekstrapolaciju od pilot studija do punih terenskih operacija.

2.8.1.1. Bioremedijacija u laboratorijskim uslovima

Da bi se dokazala uspešnost bioremedijacionog projekta nije samo dovoljno pokazati smanjenje koncentracije kontaminanta, već i da su mikroorganizmi odgovorni za to smanjenje. Iako drugi procesi mogu doprineti uklanjanju kontaminanta, mikroorganizmi treba da imaju odlučujuću ulogu. Bez dokaza o umešanosti mikroorganizama ne postoji način da se proverí da kontaminant nije jednostavno ispario, migrirao ili se izmenio abiotičkim transformacijama. Ogljedima bioremedijacije u laboratorijskim uslovima određuje se bioremedijacioni potencijal mikroorganizama koji žele da se primene na kontaminiranom zemljištu. Ovi ogleđi obuhvataju laboratorijske testove koji treba da utvrde potencijal različitih mikroorganizama da degraduju kontaminante. Ovi eksperimenti su jednostavni za izvođenje. U većini slučajeva, mikroorganizmi se uzimaju iz kontaminirane sredine i gaje se sa kontaminantom i nutrijentima u dobro kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Rezultati bioremedijacionih eksperimenata u laboratorijskim uslovima se veoma lako interpretiraju, u odnosu na rezultate bioremedijacionih ogleđa na kontaminiranom zemljištu, gde je odnos različitih uzroka i uticaja veoma teško odrediti. U tim ogleđima veoma je teško pokazati da bioremedijacioni potencijal koji je demonstriran u laboratoriji je stvarno i ostvaren na kontaminiranom zemljištu. Mikroorganizmi koji su u laboratorijskim eksperimentima pokazali znatne degradacione sposobnosti mogu pokazati znatno slabije rezultate u kontaminiranom zemljištu usled manje povoljnih uslova. Nedostatak kiseonika je primarni razlog nižeg stepena degradacije u podpovršinskom kontaminiranom zemljištu, nego u laboratorijskim dobro kontrolisanim uslovima.⁸³

2.8.1.2. *In situ* bioremedijacija

U zavisnosti od mesta izvođenja, bioremedijacione tehnologije se dele na dve podvrste: *in situ* i *ex situ* bioremedijacione tehnologije. *In situ* bioremedijacione tehnologije se izvode direktno na mestu kontaminacije, dok se kod *ex situ* bioremedijacionih tehnologija kontaminirano zemljište uklanja sa mesta kontaminacije i transportuje na mesto obrade. *In situ* bioremedijacione tehnologije su znatno jeftinije od *ex situ* bioremedijacionih tehnologija zato što omogućavaju tretman kontaminiranog zemljišta direktno na mestu kontaminacije, pri čemu se izbegavaju troškovi iskopavanja i transporta. *In situ* bioremedijacione tehnologije su veoma efikasne kad je podpovršinsko zemljište veoma propustljivo, kad obuhvata zemljište koje se nalazi na dubinama maksimalno od 8 – 10 metara i kada su podzemne vode prisutne na dubinama ispod 10 metara.⁸⁴ Dubina kontaminacije predstavlja veoma bitan faktor koji određuje da li će se *in situ* bioremedijacija primeniti. U slučaju da su kontaminacije prodrle do blizine podzemnih voda, neophodno je izvršiti iskopavanje kontaminiranog zemljišta, odnosno primeniti *ex situ* bioremedijacione tehnologije kako bi se izbegla kontaminacija podzemnih voda. Propustljivost zemljišta, takođe, ima veliki značaj. Zemljište sa niskom propustljivošću nije pogodno za *in situ* bioremedijaciju. U slučaju da se *in situ* bioremedijacione tehnologije primenjuju bez dodatne aeracije, efikasna difuzija kiseonika koja će omogućiti zadovoljavajući stepen bioremedijacije može se postići za većinu zemljišta na dubinama od nekoliko do trideset centimetara. Neke od najvažnijih *in situ* bioremedijacionih tehnologija su površinska obrada zemljišta (landfarming), bioventilacija, biorasprskavanje, biostimulacija i fitoremedijacija.

Površinska obrada zemljišta predstavlja jednu veoma jednostavnu bioremedijacionu tehnologiju koja se može primeniti i *in situ* i *ex situ*. Ova tehnologija se primenjuje za remedijaciju površinskog sloja zemljišta, a *in situ* se može primeniti ukoliko je kontaminacija plitka i ukoliko se ispod nje nalazi vodonepropusno tlo. Nakon dodavanja hranljivih supstanci površinski sloj zemljišta se povremeno prevrće radi aeracije i periodično kvasi radi očuvanja vlažnosti.

Bioventilacija je jedna od najčešće primenjivanih *in situ* bioremedijacionih tehnologija. Bioventilacija se može primeniti i kad se naftni zagađivač nalazi na većim dubinama. Princip ove tehnologije je veoma jednostavan. Vakuum se uspostavlja na određenoj dubini u kontaminiranom zemljištu pomoću vakuum pumpe koja se nalazi na površini. Tako stvoreni vakuum povlači

vazduh iz rupa koje su izbušene pored mesta kontaminacije, povlačeći sa sobom lako isparljive ugljovodonike. U bioventilaciji se primenjuje nizak protok vazduha, neophodan samo za biodegradaciju, dok se minimizira isparavanje i oslobađanje kontaminanta u atmosferu.

Biorasprskavanje je *in situ* bioremedijaciona tehnologija u kojoj se vazduh ubrizgava u kontaminirano zemljište da bi se povećala degradacija kontaminanta uz pomoć prirodno prisutnih mikroorganizama. U nekim slučajevima, da bi se stepen degradacije dodatno povećao, umesto vazduha u kontaminirano zemljište se ubrizgava čist kiseonik. Međutim, kako je ubrizgavanje čistog kiseonika veoma skupa operacija, jeftinija alternativa je nađena u korišćenju vodonik peroksida kao izvora kiseonika. Jedini nedostatak uopotrebe vodonik peroksida je njegova ogromna toksičnost prema mikroorganizmima, čak i u veoma malim koncentracijama.

Biostimulacija je *in situ* bioremedijaciona tehnologija u kojoj se vrši stimulacija mikroorganizama da degraduju kontaminant. Glavni cilj ove bioremedijacione tehnologije je ubrzavanje prirodnih biodegradacionih postupaka. Respiratorni procesi mikroorganizama se poboljšavaju dodatkom kiseonika dok se rast mikroorganizma stimuliše dodatkom hranljivih materija. To su, pre svega, jedinjenja azota i fosfora koja su neophodna za povećanje broja mikroorganizama. U slučajevima gde je u kontaminiranom zemljištu utvrđen veoma mali broj mikroorganizama, biodegradacija kontaminanta se može ubrzati dodatkom samih mikroorganizama, koji su prethodno laboratorijski umnoženi. Taj postupak se naziva reinokulacija. U posebnoj vrsti biostimulacije dodaje se izvor ugljenika kako bi se stimulisao kometabolizam. Kometabolizam se javlja kada organizmi koriste jednu vrstu jedinjenja za rast, istovremeno oksiduju druga jedinjenja koja nisu u stanju da koriste kao nutrijent ili izvor energije, ali čiji oksidacioni proizvodi su dostupni za korišćenje drugim vrstama mikroorganizama.⁸⁵

Fitoremedijacija je tehnologija u razvoju koja koristi biljke radi uklanjanja kontaminanata iz zemljišta i voda. Glavna prednost fitoremedijacionih tehnika je njihova velika ekonomičnost. Fitoremedijacija je daleko jeftinija od ostalih *in situ* i *ex situ* bioremedijacionih tehnologija. Najveći nedostatak ove tehnologije je dugo trajanje remedijacionog procesa, otežano održavanje vegetacije na lokacijama sa visokim koncentracijama kontaminanata, kao i mogućnost bioakumulacije kontaminanta u životinjama koje se hrane biljkama koje učestvuju u fitoremedijaciji. Fitoremedijacione tehnike su klasifikovane na osnovu sudbine kontaminanta u pet podvrsta: fitoekstrakcija, fitotransformacija, fitostabilizacija, fotodegradacija i rizofiltracija.

Fitoekstrakcija ili fitoakumulacija je proces koji koristi biljke radi akumulacije kontaminanta u korenu, stablu ili lišću. Za razliku od degradacionih remedijacionih tehnologija, fitoekstrakcijom se konačno dobija biljna biomasa sa akumuliranim kontaminantima koju je neophodno dodatno obraditi.

Fitotransformacija ili fitodegradacija je proces kojim se kontaminanti u biljkama transformišu u manje toksične ili manje mobilne forme.

Fitostabilizacija je proces kojim biljke smanjuju mobilnost i migraciju kontaminanata iz zemljišta. Kontaminanti se vezuju i adsorbiraju u biljnu strukturu, tako da se sprečava migracija kontaminanata.

Fitodegradacija ili rizodegradacija je proces razlaganja kontaminanata kroz procese koji se odigravaju u rizosferi. Rizosfera predstavlja uzak region zemljišta koji je direktno izložen sekreciji korena biljaka i mikroorganizmima koji se tu nalaze. Procesi u rizosferi se odigravaju između organskih molekula koji su nastali od biljaka, kao i posredstvom bakterija, kvasaca i gljiva. Rizodegradacija nastaje usled simbiotičkog odnosa između biljaka i mikroorganizama. Biljke obezbeđuju mikroorganizmima sastojke neophodne za njihov rast, dok mikroorganizmi obezbeđuju biljkama dekontaminaciju zemljišta.

Rizofiltracija je remedijaciona tehnika koja je bazirana na unosu kontaminanta od strane biljnih korena. Rizofiltracija ima sličan koncept kao i fitoekstrakcija, ali se ovom metodom češće obavlja remedijacija podzemnih voda nego remedijacija kontaminiranog zemljišta. Rizofiltracija se koristi za smanjenje kontaminacije u prirodnim močvarama ili estuarima.

2.8.1.3. *Ex situ* bioremedijacija

Kod *ex situ* bioremedijacionih tehnologija kontaminirano zemljište se iskopava i transportuje do mesta obrade koje je obloženo i pregrađeno tako da sprečava migraciju kontaminanata i ne postoji mogućnost da kontaminanti dospeju do podzemnih voda. Nezavisno od troškova iskopavanja i transportovanja kontaminiranog zemljišta, neophodno je obezbediti veliku površinu na kojoj će kontaminirano zemljište biti tretirano, što dodatno povećava troškove. *Ex situ* bioremedijacione tehnologije omogućavaju mnogo bolju kontrolu temperature, koncentracije nutrijenta, sadržaja vlage i dostupnosti kiseonika u odnosu na *in situ* bioremedijacione tehnologije. Neke od najvažnijih *ex situ* bioremedijacionih tehnologija

obuhvataju površinsku obradu zemljišta (landfarming), kompostiranje, uređene biološke gomile (halde) i bioreaktore.

Površinska obrada zemljišta može se realizovati i *ex situ* postupkom. Kontaminirano zemljište se iskopava, transportuje i raspodeljuje se tako da debljina sloja bude maksimalno 0,5 metara, pošto je ova tehnologija ograničena na tretman površinskih 10 – 35 cm zemljišta. Naneto kontaminirano zemljište se povremeno prevrće pomoću poljoprivredne mehanizacije čime se omogućuje bolja aeracija. Tokom trajanja ovog postupka nutrijenti i vlažnost se kontrolišu kako bi se poboljšala bioremedijacija. Procedne tečnosti se skupljaju sistemom cevi. S obzirom na veliku ekonomičnost, usled smanjenih troškova nadgledanja i održavanja ova jednostavna *ex situ* bioremedijaciona tehnologija dobila je veliki značaj.

Kompostiranje je tehnika koja obuhvata mešanje kontaminiranog zemljišta sa bezopasnim organskim materijalom kao, na primer, đubrivo ili otpad iz poljoprivredne industrije. Prisustvo organskog materijala podržava razvoj mikrobiološke populacije i usled dejstva mikroorganizama temperatura komposta se može povećati i do 65 °C. Tokom trajanja kompostiranja, vlaga, temperatura, nutrijenti i kiseonik se kontrolišu kako bi se poboljšala bioremedijacija. Neprijatni mirisi koji mogu nastati tokom ovog postupka se uklanjaju pomoću filtera za prečišćavanje vazduha. Kompost nastao ovom bioremedijacionom tehnologijom se može koristiti kao đubrivo za poljoprivredno zemljište, ili se može odlagati u sanitarnim deponijama. Ova bioremedijaciona tehnologija je skuplja od površinske obrade zemljišta ali zato kraće traje.

Uređene biološke gomile (halde) predstavljaju hibrid površinske obrade zemljišta i kompostiranja. Kontaminirano zemljište, nakon iskopavanja se meša sa materijalom koji mu povećava rastresitost. Nakon toga se ono raspodeljuje preko vodonepropusne obloge, kako bi se izbegla migracija kontaminanata. Vodonepropusne obloge su najčešće načinjene od polietilenskih podloga. Za aeraciju halde koristi se sistem cevi za distribuciju vazduha vakuum pumpama ili uduvavanjem. Tokom trajanja ovog postupka nutrijenti i vlažnost se kontrolišu, kako bi se poboljšala bioremedijacija. Procedne tečnosti se sakupljaju sistemom cevi. U toku trajanja ovog postupka kontaminirano zemljište se, takođe, prekriva nepropusnom folijom, kako bi se izbegao gubitak kontaminanata i vode isparavanjem, kontrolisale atmosferske tečnosti i kako bi se obezbedila termalna izolacija halde. Optimalna bioremedijacija odigrava se na temperaturama od 20 – 40 °C. Ova bioremedijaciona tehnologija se može porediti sa

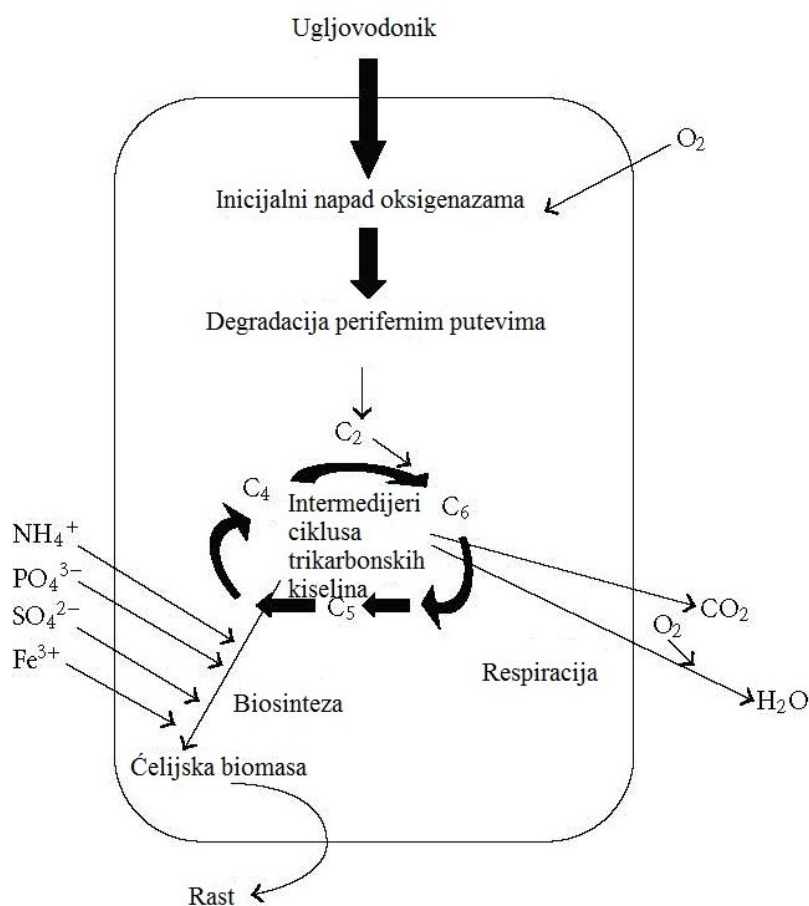
površinskom obradom zemljišta. Za razliku od površinske obrade zemljišta gde se aeracija omogućuje prevrtanjem zemljišta, kod haldi se aeracija obezbeđuje sistemom za aeraciju. Pored različitog sistema aeracije glavna razlika između ove dve bioremedijacione *ex situ* tehnologije je u debljini sloja kontaminiranog zemljišta koje je izloženo bioremedijaciji. Kod hadi je debljina sloja kontaminiranog zemljišta znatno veća nego kod površinske obrade zemljišta tako da je za ovu tehnologiju neophodna znatno manja površina za tretman kontaminiranog zemljišta. Glavne prednosti ove tehnologije su jednostavnost primene, zatvorenost sistema i kratko vreme obrade.

Bioreaktori se koriste za tretman kontaminiranog zemljišta dejstvom mikroorganizama ili enzima. Ova bioremedijaciona tehnologija je znatno brža u odnosu na navedene *ex situ* bioremedijacione tehnologije. Ova tehnologija se još naziva i bioremedijacija u tečnom stanju. Princip tehnologije je jednostavan. Kontaminirano zemljište se meša sa vodom u reaktoru. Dobijenoj suspenziji se dodaju hranljive i površinski aktivne supstance uz mehaničko mešanje i aeraciju u slučaju da se koriste aerobni mikroorganizmi. Količina suve materije u suspenziji kreće se od 10 do 30%. Zahvaljujući zatvorenom sistemu, kod bioreaktora je moguća odlična kontrola temperature, pH i aeracije. Zahvaljujući dobroj kontroli, obim degradacije kontaminanta je znatno veći kod bioreaktora nego kod drugih bioremedijacionih tehnologija. Nakon tretmana, voda iz bioreaktora se odlaže ili se dodatno obrađuje u slučaju da i dalje sadrži kontaminante. Ova bioremedijaciona tehnologija je znatno pogodnija za tretman zemljišta male permeabilnosti.

2.8.2. Mikroorganizmi – razlagači ugljovodonika nafte

Mikroorganizmi razlagači ugljovodonika su široko rasprostranjeni u zemljištu, slanim i slatkim vodama. Od različitih vrsta mikroorganizama bakterije, kvasci i gljive predstavljaju glavne degradere ugljovodonika. S druge strane, utvrđeno je da alge i protozoe nemaju značajnu ulogu u degradaciji ugljovodonika.^{86,87} Mikroorganizmi koji su sposobni da razlažu prirodno prisutne ugljovodonike u životnoj sredini, mogu da razlažu i ugljovodonike koji potiču od naftnog zagađivača. Bakterije imaju najvažniju ulogu u degradaciji naftnog zagađivača i deluju kao primarni degraderi ugljovodonika koji potiču od prosute nafte. Tipične bakterijske vrste već poznate po svojim sposobnostima da vrše degradaciju ugljovodonika čine *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphigonomas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia* i

Gordonia vrste.⁸⁸ Plesni *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces*, *Graphium* i kvasci *Candida*, *Yarrowia* i *Pichia* su uočeni kao degraderi ugljovodonika.⁸⁹ Najbrža i najkompletnija degradacija većine organskih zagađujuće supstance se obavlja pod aerobnim uslovima. Na slici 8. prikazan je glavni princip aerobne degradacije ugljovodonika, pri čemu se ugljovodonici koriste za dobijanje energije i za rast mikroorganizama. Nakon inicijalnog napada oksigenazama, organska zagađujuća supstanca se perifernim degradacionim putevima postepeno konvertuje do centralnim intermedijera, na primer, ciklusom trikarbonskih kiselina. Biosinteza ćelijske biomase započinje od centralnih prekursorskih metabolita, na primer acetil-Co-A, sukcinata i piruvata.

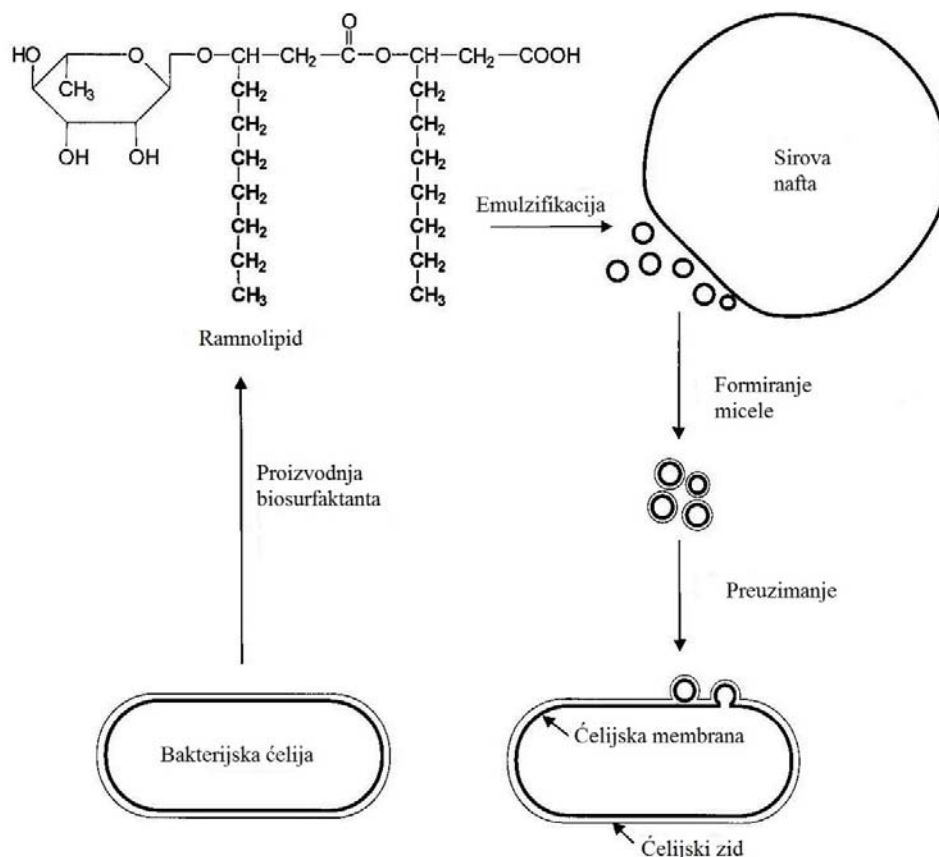


Slika 8. Glavni princip aerobne degradacije ugljovodonika od strane mikroorganizama⁹⁰

Degradacione sposobnosti mikroorganizma uslovljene su kataboličkim genima i enzimima.^{91,92,93,94} Pojedine vrste mikroorganizama imaju sposobnost da razgrade samo određena jedinjenja prisutna u naftnom zagađivaču. Zajednice mešanih mikrobioloških kultura poseduju

više različitih enzima, a samim tim i šire degradacione sposobnosti. Sojevi mikroba koji pripadaju različitim rodovima su nađeni u zemljištu ili vodama kontaminiranim naftnim zagađivačem. To jasno ukazuje da svaki soj ima svoju ulogu u razgradnji naftnog zagađivača. Prednost mešanih kultura u odnosu na monokulture se odnosi na sinergističke interakcije između pojedinih vrsta mikroorganizama. Te sinergističke interakcije mogu biti različite. Moguće je, na primer, da jedna mikrobiološka vrsta uklanja metabolite koji su toksični za drugi mikrobiološku vrstu. Takođe je moguće da je druga vrsta u mogućnosti da degraduje neko jedinjenje koje je prva vrsta samo parcijalno degrađovala. Neke od komponenti naftnog zagađivača se mogu ukloniti samo kometabolički, zajedničkim dejstvom više različitih vrsta mikroorganizama. Osim mikroorganizama koji primarno degraduju naftni zagađivač, u zemljištu su prisutni i drugi mikroorganizmi koji mogu da koriste degradacione proizvode, a da sami nemaju mogućnost razlaganja. Takvi mikroorganizmi dodatno pomažu uklanjanju naftnog zagađivača.

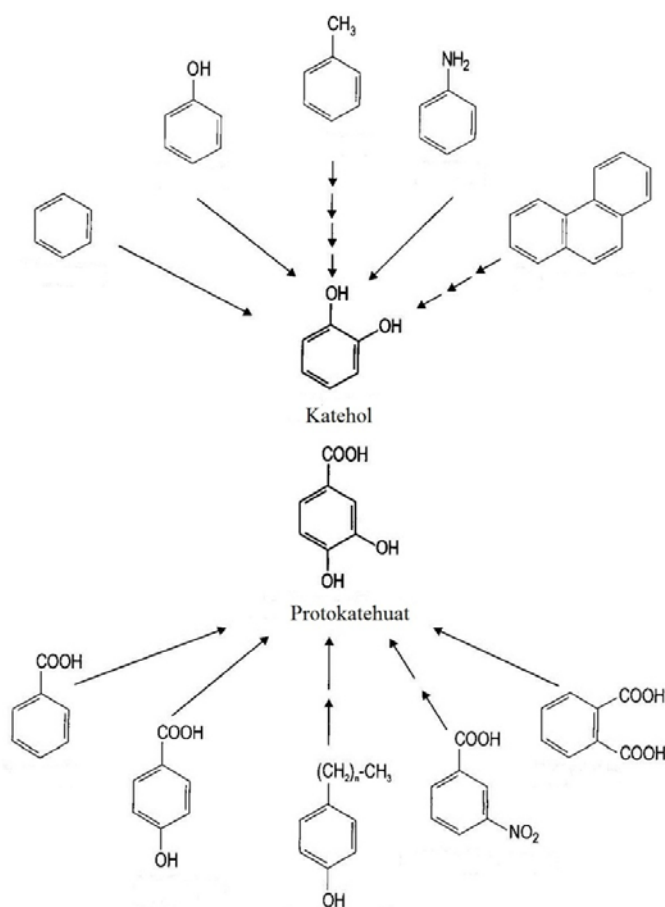
Za degradaciju je neophodno da mikroorganizmi i kontaminant budu u kontaktu. To često nije lako ostvariti, s obzirom na to da niti mikrobi niti kontaminant nisu uniformno raspoređeni u zemljištu. Pojedine bakterije su mobilne, mogu da osete kontaminant i da se kreću ka njemu. Drugi mikroorganizmi, kao gljive, rastu u filamentnoj formi prema kontaminantu. Osim toga, mikroorganizmi poseduju različite mehanizme za hidrofobne supstrate kao što su modifikacija ćelijske membrane, proizvodnja površinskih aktivnih supstanci ili upotreba efluks pumpi radi smanjenja koncentracija toksičnih supstanci.⁹⁵ Mehanizam pomoću kojeg se mikroorganizmi vezuju na kapljice naftnog zagađivača još uvek nije razjašnjen, dok je proizvodnja biosurfaktanata od strane mikroorganizma veoma dobro proučena. Biosurfaktanti predstavljaju heterogenu grupu površinski aktivnih jedinjenja koja se proizvodi od više različitih vrsta mikroorganizama. Biosurfaktanti poboljšavaju solubilizaciju i uklanjanje kontaminanta.^{96,97} Biodegradacija se poboljšava dejstvom biosurfaktanta usled povećanja biodostupnosti kontaminanta.⁹⁸ *Pseudomonas* je jedna od najpoznatijih bakterija po proizvodnji biosurfaktanata ramnolipida. Biosurfaktant gradi micelle u kojima se nalazi rastvorni kontaminant. Mikroorganizmi preuzimaju kontaminant iz micela i nisu u mogućnosti da direktno koriste kontaminant. Na slici 9. prikazana je proizvodnja biosurfaktanata od strane bakterijske ćelije i preuzimanje ugljovodonika od strane bakterije stvaranjem micela.



Slika 9. Upotreba biosurfaktanata (ramnolipida) od strane bakterijske ćelije.⁶⁵

Aerobne bakterije i gljive poseduju različite enzime i katabolički različite puteve za razgradnju organskih jedinjenja. Oksidacija organske supstance je katalizovana različitim enzimima oksigenazama, peroksidazama i lakazama. Oksidaze su oksidoreduktaze koje vrše oksidaciju substrata transferom kiseonika iz molekuskog O_2 . Postoje dva tipa oksigenaza: monooksigenaze koje vrše transfer jednog atoma kiseonika u supstrat, a redukciju drugog atoma kiseonika u vodu, i dioksidgenaze koje inkorporiraju oba atoma kiseonika u supstrat. Gljive transformišu širok spektar organskih jedinjenja koristeći ekstracelularne peroksidaze i lakaze - lignolitičke gljive i intracelularne citohrom P450 monooksigenaze – nelignolitičke gljive. Lignolitičke gljive se hrane celulozom iz drveta. Da bi konzumirale celulozu neophodno je da razlože lignin. To uspeavaju uz pomoć ekstracelularnih enzima, koji nespecifičnim i slobodnoradikalnim reakcijama degraduju lignin. Zahvaljujući ovom jedinstvenom mehanizmu, ove vrste gljiva mogu da degraduju i neka od najtežih biodegradabilnih jedinjenja (npr. PAH sa

više kondenzovanih aromatičnih prstena). Proizvodi degradacije gljiva su često nespecifični, nepotpuni i često rezultiraju u nastajanju još toksičnijih metabolita u odnosu na polazna jedinjenja.⁹⁹ Za razliku od gljiva, bakterije koriste specifične kataboličke puteve, koji počinju serijom različitih enzimski katalizovanih reakcija težeći da veći broj ugljovodonika transformišu u manji broj intermedijera centralnih metaboličkih puteva. Polazna organska jedinjenja se različitim perifernim putevima prevode do centralnih intermedijera, kao što su katehol i protokatehuat, koji zatim ulaze u ciklus trikarbosnih kiselina, što je prikazano na slici 10.

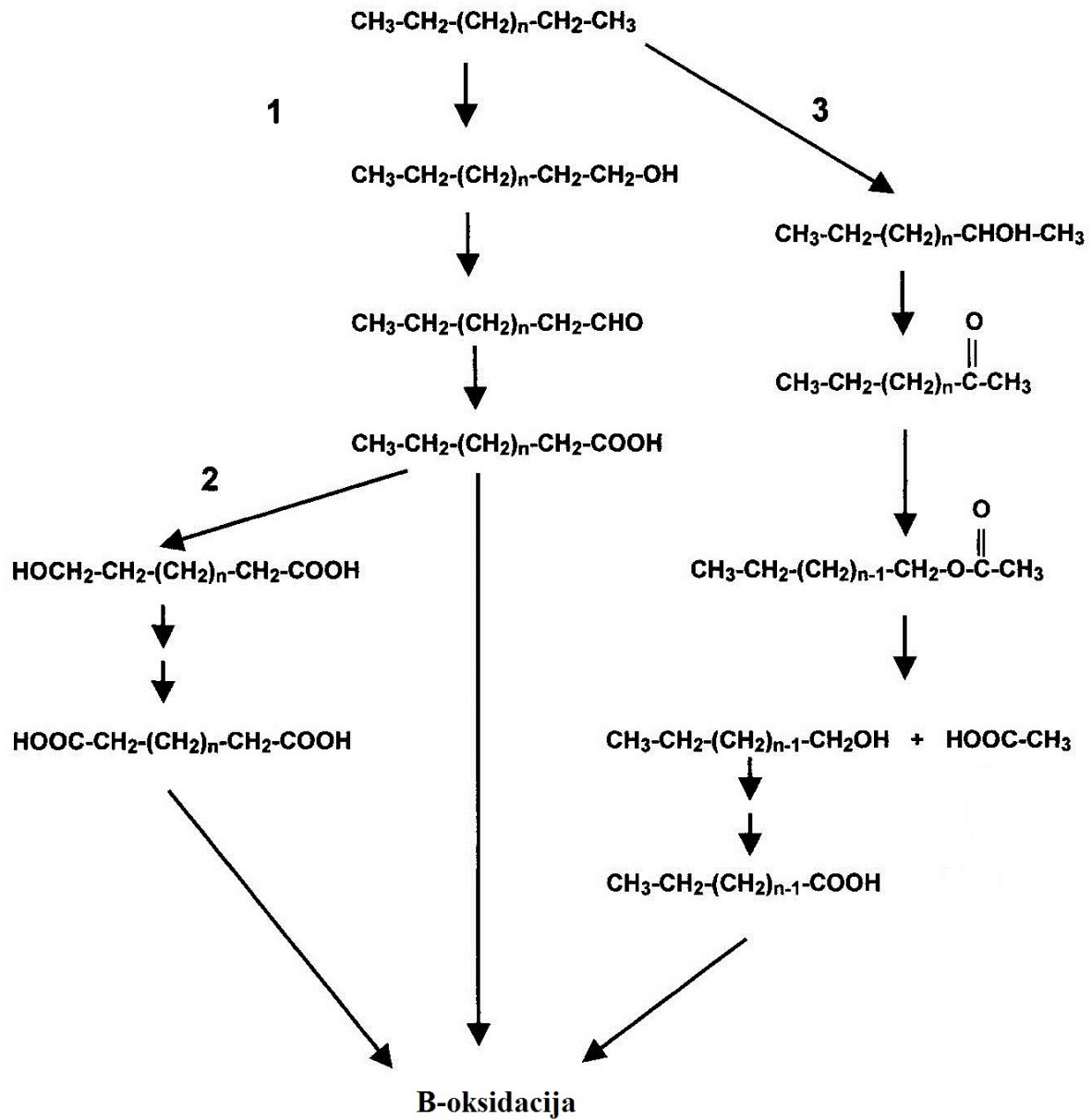


Slika 10. Različita organska jedinjenja se prevode perifernim putevima do centralnih intermedijera, katehola i protokatehuata.⁹⁰

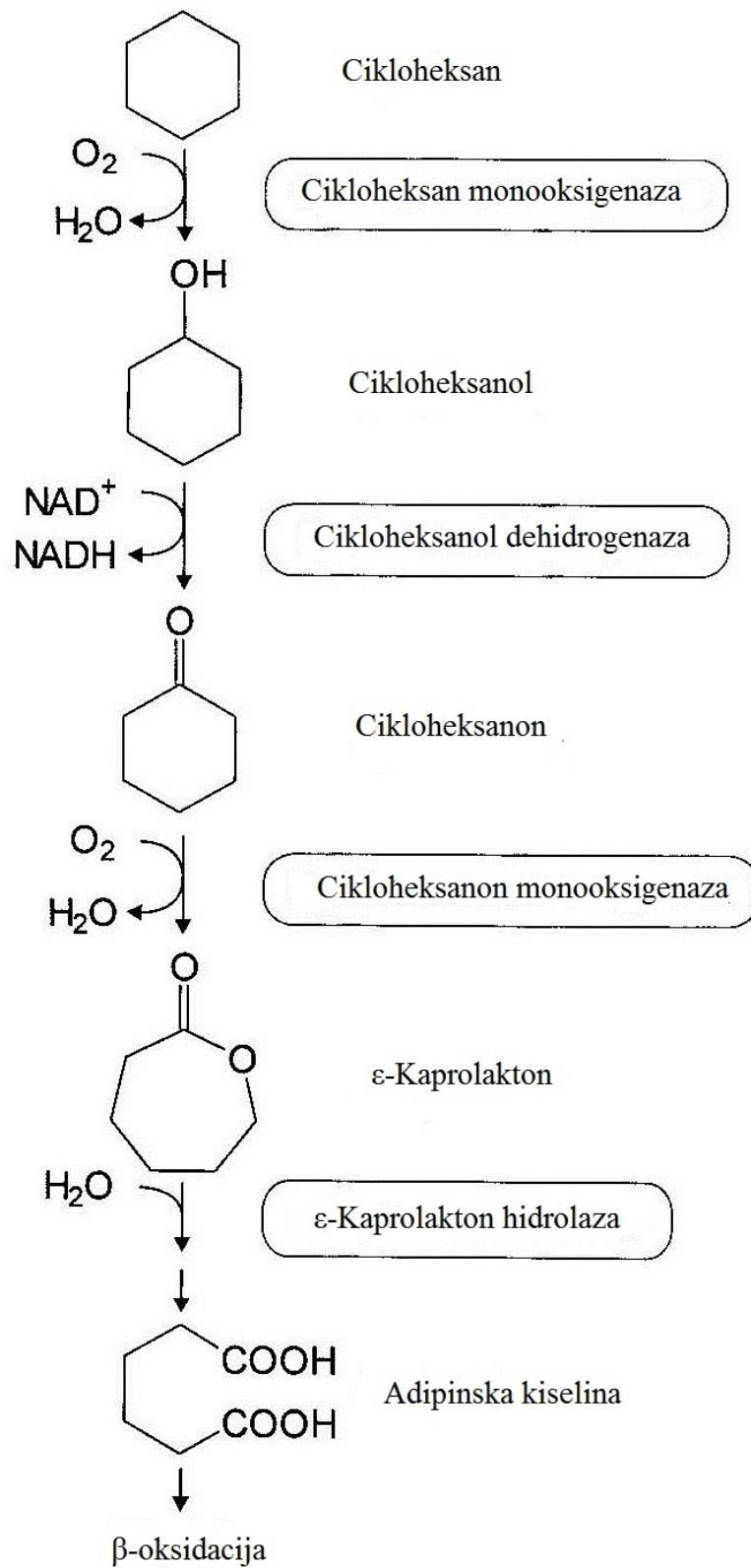
Na strukturalnoj osnovi ugljovodonici nafte se mogu podeliti na alkane (normalne ili iso-), cikloalkane i aromate. Biorazgradljivost pojedinih komponenata naftnog zagađivača pre svega zavisi od njihove hemijske strukture, ali fizičko stanje i toksičnost, takođe, imaju značajnu ulogu. *n*-Alkani predstavljaju najbiodegradabilniju komponentu naftnog zagađivača. Ali između

degradabilnosti pojedinih homologa postoje znatne razlike. C₅-C₁₀ homolozi *n*-alkana su veoma toksični prema mikroorganizmima, zato što teže kao rastvarači da poremete strukturu lipidne membrane mikroorganizma. *n*-Alkani u C₂₀-C₄₀ opsegu se nalaze u čvrstom agregatnom stanju na uobičajenim spoljašnjim temperaturama. Smanjena biodegradabilnost viših *n*-alkana je posledica njihovog fizičkog stanja i smanjene biodostupnosti. Sa porastom molekulske mase *n*-alkana dolazi do smanjenja njihove rastvorljivosti, odnosno do smanjenja njihove biodostupnosti mikroorganizmima. Većina mikroorganizama obavlja terminalnu oksidaciju *n*-alkana, dok manji broj izvodi subterminalnu oksidaciju. Proizvod terminalne oksidacije *n*-alkana je primarni, dok je proizvod subterminalne oksidacije sekundarni alkohol. Alkohol se zatim oksiduje do aldehida, koji se konačno oksiduje do karboksilne kiseline koja se kasnije degraduje beta oksidacijom. Metil račvanja u molekulu ugljovodonika ometaju beta oksidaciju i zahtevaju diterminalnu oksidaciju ili druge zaobilazne mehanizme. Zbog toga je oksidacija *n*-alkana znatno olakšana u odnosu na iso alkane. Na slici 11. prikazani su različiti mehanizmi oksidacije *n*-alkana.

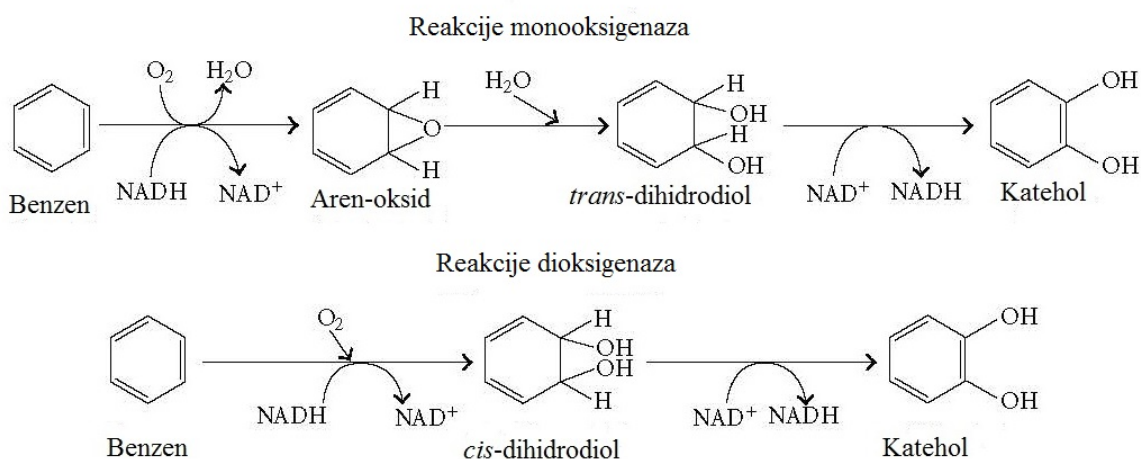
Cikloalkani se prvo transformišu do cikličnih alkohola koji se, zatim, dehidratišu do odgovarajućih ketona. Nakon toga, sistem monooksidaza laktonizuje prsten, dok odgovarajuće lakton hidrolaze otvaraju prsten. Dva navedena enzima se gotovo nikad ne javljaju kod istih vrsta mikroorganizma i zato je gotovo nemoguće izolovati čiste mikrobiloške kulture koje mogu da budu gajene isključivo na cikloalkanima.¹⁰⁰ Ipak, sinergističkim dejstvom više mikroorganizma moguća je degradacija različitih cikloalkana. Kao i u slučaju nižih alkana, niži cikloalkani kao ciklopropan, ciklobutan i ciklopentan imaju izrazito toksično dejstvo na mikroorganizme usled destabilizacije njihove lipidne membrane. Visoko kondenzovana ciklična jedinjenja imaju smanjenu biodegradabilnost usled njihove strukture, njihovog fizičkog stanja i smanjene biodostupnosti mikroorganizmima usled niže rastvorljivosti. Na slici 12. je prikazan mehanizam oksidacije cikloalkana.



Slika 11. Oksidacija alkana: terminalna oksidacija alkana (1), diterminalna oksidacija alkana (2) i subterminalna oksidacija alkana (3)¹⁰¹

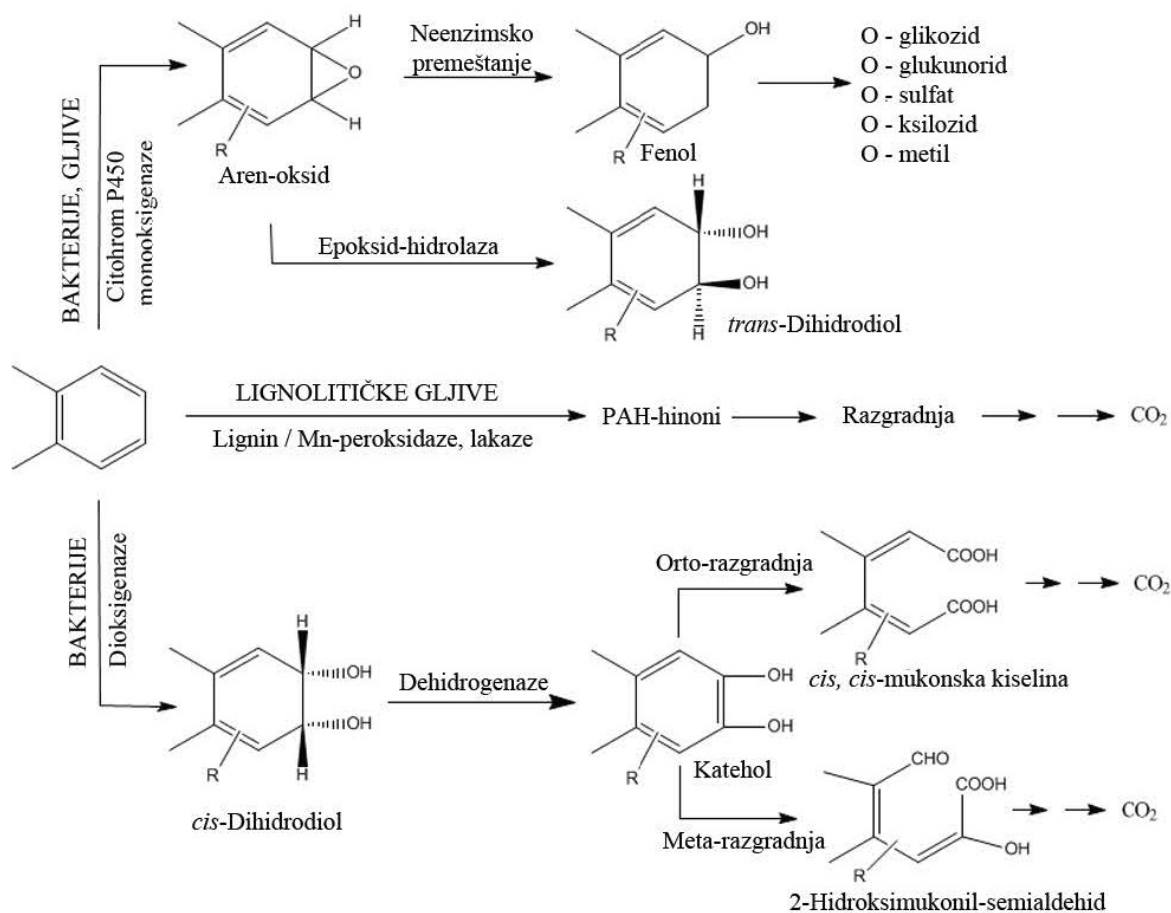
Slika 12. Mehanizam oksidacije cikloalkana⁹⁰

Aromatična jedinjenja se degraduju na dva različita načina uz korišćenje različitih enzima. Prokarioti započinju degradaciju aromatičnih jedinjenja napadom dioksigenaza, čime nastaju *trans* dihidrodioli, koji se kasnije oksiduju do dihidroksi proizvoda. U slučaju oksidacije benzena nastaje npr. katehol. Eukarioti koriste monooksigenaze. Benzen se oksidacijom monooksigenazama prevodi u benzen 1,2 oksid koji se dejstvom vode prevodi u *cis* dihidrodiol. Oksidacijom dihidrodioli se prevode u katehol, ključni intermedijer u biodegradaciji aromata, koji kasnije može da se degraduje orto ili meta cepanjem do mukonske kiseline ili 2-hidroksimukonil semialdehida. Mehanizmi oksidacije benzenovog prstena dejstvom monooksigenaza i dioksigenaza prikazani su na slici 13.



Slika 13. Mehanizmi oksidacije benzena dejstvom monooksigenaza i dioksigenaza.⁹⁰

Kod kondenzovanih policikličnih aromata degradacija počinje degradacijom pojedinačnih aromatičnih prstenova. Biodegradabilnost kondenzovanih aromatičnih jedinjenja opada sa povećanjem broja aromatičnih prstena i stepenom kondenzacije. Biodegradabilnost jedinjenja se dodatno smanjuje sa porastom alkil supstituenta na aromatičnim prstenovima.^{51,102,103} Aromati sa više od četiri kondenzovana prstena smatraju se lošim supstratima za rast mikroorganizama. Glavne putanje aerobne razgradnje policikličnih aromatičnih ugljovodnika (PAH) od strane bakterija i gljiva su prikazane na slici 14.



Slika 14. Glavne putanje za aerobnu razgradnju PAH-ova kod bakterija i gljiva.¹⁰⁴

2.8.3. Podloge povoljne za razvoj mikroorganizama, razlagača nafte

Podloge koje se koriste za određivanje i kultivaciju mikroorganizama razlagača nafte i naftnih derivata mogu biti različite. Uglavnom se koriste mineralne podloge kojima se dodaju nafta i naftni derivati kao izvor ugljenika koji ovi mikroorganizmi koriste. U daljem tekstu navedeni su neki od primera podloga za određivanje i za kultivaciju mikroorganizama razlagača nafte.

Za određivanje broja mikroorganizama razlagača nafte koriste se sledeće podloge.

A. Podloga za određivanje broja mikroorganizama sposobnih da razlažu ugljovodonik sa dizelom D2 kao izvorom ugljenika¹⁰⁵

Sastav:

NH₄NO₃..... 1 g,

K₂HPO₄.....0,25 g

Ekstrakt zemlje.....50 mL

Agar.....16 g

Demineralizovana voda.....1,0 L

pH 6,5-7,5

pH se podešava dodatkom H₂SO₄ (1M) ili NaOH (1M). Podloga se sterilize u autoklavu 0,10 MPa tokom 20 minuta ukoliko nije drugačije naglašeno. Nakon izvršene sterilizacije u sterilnim uslovima podlozi se dodaje dizel D2 (2000 ppm ij. 2g ili 2.35ml).

B. Podloga za određivanje broja bakterija sposobnih da razlažu ugljovodonike koje koriste dizel D2 kao izvor ugljenika¹⁰⁵

Podloga se priprema na isti način kao gore navedena podloga uz dodatak 100 mg aktidiona nakon izvršene sterilizacije. pH podloge je 6,5-7,5.

C. Podloga za određivanje broja mikroorganizama sposobnih da koriste fenantren kao izvor ugljovodonika¹⁰⁵

Podloga se priprema kao gore navedena podloga uz dodatak 200 ppm fenantrena u etarskom rastvoru posle izvršene sterilizacije. pH podloge je 6,5-7,5.

D. Podloga za kultivaciju mikroorganizama razlagača nafte¹⁰⁵

Startna podloga

Sastav:

Hranljivi bujon.....23,3 g

Kontaminirana zemlja.....100 g

Mazut/Dizel/Ekstrakt TPH.....20 g
Demineralizovana voda.....2000 mL
pH 7,0

Podloga se pripremaa rastvaranjem sastojaka u demineralizovanoj vodi, zatim se sterilije u autoklavu. Nakon sterilizacije u autoklavu u sterilnim uslovima se ohlađenoj podlozi dodaje mazut ili dizel ili THP kao izvor ugljovodonika.

Radna podloga

Sastav:

Autolizat kvasca.....7,5 kg
Ekstrakt zemlje.....50 L
KCl..... 100 g
NH₃.....261 mL
H₃PO₄.....120 mL
Mazut/Dizel.....10 kg
Česmenska voda.....≈ 900 L
pH 7,0

Sve komponente su rastvorene direktno u mobilnom bioreaktoru. Podloga nije sterilisana već je selektivnost postignuta visokom koncentracijom naftnih ugljovodonika.

E. Mineralna podloga sa sirovom naftom¹⁰⁶

Sastav po litru:

K₂HPO₄..... 0.45g
(NH₄)₂SO₄..... 0.1g
MgSO₄·7H₂O 0.02g
NaCl0.01g
CaCl₂0.01g
FeCl₃.....0.002g
Nafta..... 5.0mL
pH 7.2

Sve komponente izuzev nafte se rastvore u destilovanoj /dejonizovanoj vodi i dobro se promešaju. Steriliše se u autoklavu, zatim se ohladi na 50 °C. U aseptičnim uslovima dodaje se 5,0 ml sirove nafte sterilisane filter metodom i dobro promeša.

2.8.4. Biostimulacioni faktori

Da bi bioremedijacija bila uspešna neophodno je da mikroorganizmi razlagači ugljovodonika nafte budu prisutni na mestu kontaminacije i da enzimskim napadom konvertuju naftnu zagađujuću supstancu do bezopasnih jedinjenja. Ipak, samo prisustvo mikroorganizama nije dovoljno, s obzirom na to da je mikrobiološka razgradnja zavisna od brojnih faktora uključujući različite faktore životne sredine kao, na primer, dostupnost supstrata, nutrijente, elektron donore i akceptore, pH i temperaturu. Bioremedijacija često uključuje manipulaciju faktorima životne sredine, budući da je bioremedijacija uspešna samo kada faktori životne sredine omogućuju rast i aktivnost mikroorganizama. To rezultira rastom mikrobiološke populacije, što dovodi do efikasnije i brže degradacije naftnog zagađivača. Proces stimulisanja rasta mikrobiološke populacije radi degradacije zagađujuće supstance je poznat po imenu biostumulacija. Biostimulacija se može izvesti dodatkom nutrijenata koji limitiraju rast mikroorganizama, elektron akceptora (pre svega kiseonika) ili čak dodatkom dodatnog izvora ugljenika (na primer melasa).

Nutrijenti

Pored ugljenika, vodonika i kiseonika mikroorganizmima su potrebni i neki drugi nutrijenti za njihov razvoj kao i za stvaranje enzima neophodnih za degradaciju kontaminanta. Sastav mikrobiološke ćelije je predstavljen u tabeli 3.

Tabela 3. Sastav mikrobiološke ćelije¹⁰⁷

Element	Zastupljenost u procentima (%)
Ugljenik	50
Azot	14
Kiseonik	20

Vodonik	8
Fosfor	3
Sumpor	1
Kalijum	1
Natrijum	1
Kalcijum	0,5
Magnezijum	0,5
Hlor	0,5
Gvožđe	0,2
Svi ostali elementi	0,3

Iz tabele se vidi da, pored ugljenika koji je gradivni element mikrobioloških ćelija, azot i fosfor imaju značajnu zastupljenost u sastavu mikrobiološke ćelije. Uobičajeno je da naftni kontaminant predstavlja izvor ugljenika za mikroorganizme, dok je kontaminirano zemljište uglavnom siromašno u azotu i fosforu. Nedostatak ova dva elementa predstavlja limitirajući faktor za rast mikrobiološke populacije. Dodatkom ova dva sastojka zemljištu povećava se rast mikroorganizama i ubrzava se proces degradacije kontaminanta. Nutrijenti se dodaju kontaminiranom zemljištu do uspostavljanja masenog odnosa ugljenik:azot:fosfor (C:N:P) od oko 120:10:1 što približno odgovara njihovom odnosu u ćelijskoj biomasi.^{108,109,110} Kao nutrijenti u bioremedijaciji najčešće se upotrebljavaju neorganske soli azota i fosfora, a može se primenjivati i đubrivo organskog porekla (stajsko đubrivo, mulj).

Aeracija

U većini kontaminiranih zemljišta, sedimenata i voda, prisustvo kiseonika predstavlja ograničavajući faktor za biodegradaciju ugljovodonika, s obzirom na to da je većina bioremedijacija zasnovana na aerobnim procesima. Radi efikasnije aeracije u kontaminiranoj sredini se primenjuju različite metode poput prevrtanja, mehaničkog mešanja, bioventilacije, injektiranje vazduha ili čistog kiseonika ili injektiranje peroksida.

Surfaktanti

Niska rastvorljivost i adsorpcija pojedinih komponenti naftnog zagađivača limitira njihovu dostupnost mikroorganizmima. Dodatak surfaktanata povećava rastvorljivost i biodostupnost pojedinih komponenti naftnog zagađivača mikroorganizmima. Na taj način se povećava ukupna količina degradovanih ugljovodonika, odnosno povećava stepen biodegradacije. Mogu se koristiti surfaktanti hemijskog i biloškog porekla. Kada je reč o hemijskim surfaktantima, oni bi trebalo da budu biodegradabilni i da ne inhibiraju rast mikroorganizma. Pojedini mikroorganizmi su sposobni da sami sintetišu biosurfaktante, ali se se smatra da količina tako stvorenih biosurfaktanata nije dovoljna za efikasnu bioremedijaciju.

Vlažnost

Prisustvo vode u zemljištu i sedimentima neophodno je za normalne životne procese mikroorganizama, budući da prisustvo vode u zemljištu utiče na kretanje mikroorganizama, prilikom nutijenata i odstranjivanje metaboličkih proizvoda. Prevelik sadržaj vlage u zemljištu ograničava prilikom molekularnog kiseonika. Sadržaj vlage u zemljištu u iznosu od 50 do 80% od ukupne slobodne zapremine u porama zemljišta se smatra idealnim za biodegradaciju. Nedovoljna vlažnost ograničava rast mikroorganizama, dok prevelika vlažnost smanjuje aeraciju zemljišta.

Temperatura

Biodegradacija ugljovodonika u životnoj sredini odvija se u širokom opsegu temperature. S porastom temperature enzimsko aktivnost mikroorganizama raste, tako što se udvostručava za svakih 10 °C sve do temperature od 77 °C kad dolazi do denaturacije enzima. Pored mikroorganizama, temperatura ima uticaj i na sam naftni zagađivač, s obzirom na to da od temperature zavisi sastav, viskozitet i rastvorljivost naftnog zagađivača. Snižavanje temperature negativno utiče na biodegradaciju. Pri temperaturama nižim od 0 °C dolazi do zamrzavanja vode u zemljišnom rastvoru, isparavanje ugljovodonika manje molekulske mase je sprečeno, ugljovodonici veće mase se manje rastvaraju u vodi ili postoje kao tečnosti, pa je njihova biodegradacija sprečena njihovom ograničenom biodostupnošću. Optimalna temperatura za biodegradaciju u slatkovodnim sistemima je od 20–30 °C, dok je u zemljištima od 30–40 °C.

pH

Većina bakterija preferira neutralne uslove, dok su gljive otpornije prema kiselijim uslovima. Ekstremne pH vrednosti imaju negativne uticaje na mikroorganizme koji biodegradiju naftu. pH vrednosti između 6 i 8 su poželjne za većinu mikroorganizama koji biodegradiju naftu. Ukoliko je kontaminirano zemljište kiselije, pH se podešava dodavanjem kreča, dok ukoliko je suviše alkalno, dodaje se amonijum sulfata.

Zemljište

Veličina čestica zemljišta ima značajan uticaj na bioremedijacione procese. Fino sprášena zemljišta imaju manju permeabilnost od zemljišta sa krupnim česticama, što obično rezultuje otežanim transportom vlage, hranljivih materija i kiseonika. Radi poboljšanja karakteristika fino sprášenom zemljištu može se dodavati piljevina ili slama. Na bioremedijacione procese utiče i sastav zemljišta. Sorpcija na česticama zemljišta rezultuje u smanjenoj dostupnosti naftnog zagađivača mikroorganizmima, što je veoma izraženo kod zemljišta sa većim sadržajem organske supstance (huminskim materijama) i glina.

3. NAŠI RADOVI

Sastav naftnih zagađujućih supstanci u životnoj sredini pod dejstvom mikroorganizama podložan je intenzivnim promenama. Cilj ove doktorske disertacije je da se ispita uticaj bioremedijacionih uslova na biodegradaciju zasićenih i aromatičnih ugljovodonika u zagađivačima naftnog tipa. Izvedena istraživanja trebalo bi doprinesu usavršavanju bioremedijacionih tehnika.

U ovoj doktorskoj disertaciji opisana su četiri različita eksperimentalna pristupa koja su deo velikog istraživanja pri kojem su analizirani različiti aspekti bioremedijacije životne sredine zagađene naftnim zagađivačem. U ovoj doktorskoj disertaciji su originalno izloženi rezultati eksperimenta *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom i oglada višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim zagađivačem. Rezultati ovih oglada su zatim upoređeni sa rezultatima prethodno publikovanih eksperimenata, oglada *ex situ* bioremedijacije koji su originalni rezultati doktorske teze Dr Vladimira Beškoskog¹⁰⁵, i rezultatima oglada simulirane biodegradacije u laboratoriji koji originalni rezultati doktorske teze Dr Mile Ilić¹¹¹.

Simulirana biodegradacija u laboratoriji

Ogledom simulirane biodegradacije u laboratoriji procenjivan je bioremedijacioni potencijal aerobnih zimogenih mikroorganizma iz zemljišta na biodegradaciju naftnih zagađujućih supstanci. Zimogeni mikroorganizmi su izolovani iz zemljišta u blizini kanala otpadnih voda pored naftne rafinerije Pančevo. Voda u tom kanalu potiče uglavnom od otpadnih voda iz naftne rafinerije i azotare, i znatno je zagađena naftom i njenim derivatima. S obzirom na to da se u kanal kontinuirano već godinama ispuštaju ugljovodonici, smatra se da su se mikroorganizmi iz kanalske vode prilično dobro adaptirali, i da su vrlo aktivni u degradaciji različitih klasa organskih jedinjenja nafte. Analizom izolovanih zimogenih mikroorganizama je ustanovljeno da su najzastupljenije bile bakterije iz roda *Bacillus* i *Aktinomicete*, dok je od gljiva najzastupljeniji bio rod *Penicillium*. Smeša parafinskih nafti je korišćena kao supstrat za zimogene mikroorganizme. Laboratorijski eksperimenti simulirane biodegradacije trajali su 15, 30, 45, 60 i 75 dana. Cilj je bio da se proceni u kolikoj meri će zimogeni mikroorganizmi razgrađivati *n*-alkane, izoprenoide i policiklična alkane tipa sterana i terpana od zasićenih ugljovodonika i fenantren i njegove metil izomere od aromatičnih.

***ex situ* Bioremedijacija – Rafinerija nafte Pančevo, maj-novembar 2006. godina**

Izvođeni su i eksperimenti *ex situ* bioremedijacije zemljišta na lokalitetu rafinerije nafte Pančevo. Eksperimenti su izvođeni u periodu od šest meseci (maj-novembar 2006. godine). Kontaminirano zemljište prikupljeno je sa različitih lokacija rafinerije nafte Pančevo. Kontaminirano zemljište je bilo pomešano sa piljevinom, estrima dugolančanih alkohola i masnih kiselina i prirodnim đubrivom. Piljevina je dodata radi poboljšanja aeracije. Estri dugolančanih alkohola i masnih kiselina su dodati kao biodegradabilni supstrati, dok je prirodno đubrivo dato kao izvor azota i fosfora radi stimulacije mikroorganizama. Nakon toga, zemljište je oblikovano u haldu i instalirane su cevi za aeraciju i sistem za prikupljanje procedne tečnosti. Mikroorganizmi za koje se smatra da mogu da efikasno degraduju ugljovodonike su umnoženi u laboratorijskom bioreaktoru i kao aktivna biomasa su aplikovani na haldu jednom nedeljno. Uzorci su uzimani u vremenskim razmacima od dve nedelje, tako da je ukupno sakupljeno dvanaest uzorka (uzorci označeni od P₁-P₁₂). Analizom prikupljenih uzoraka praćene su promene u količini i sastavu nafte (bioremedijacioni efekat).

***ex situ* Bioremedijacija – zemljište zagađeno mazutom,
septembar 2009 – mart 2010. godina**

U periodu od septembra 2009. godine do marta 2010-te, izvođeni su eksperimenti *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom. Kontaminirano zemljište je iskopano iz zemljišta elektrane. To zemljište je bilo zagađivano oko godinu dana mazutom koji je cureo iz rezervoara elektrane. Iz zemljišta kontaminiranog mazutom je izolovan konzorcijum mikroorganizama. Konzorcijum su sačinjavale sledeće kulture mikroorganizama: *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas luteola*, *Achromobacter denitrificans*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Aeromonas hydrophilia*. Oko 210m³ kontaminiranog zemljišta (približno oko 150 tona) je ravnomerno raspodeljeno preko neispiranog peska iz reke Save. Oko 10 m³ pomešanog materijala je odvojeno u kontrolnu gomilu. Preostali materijal je bio pomešan sa piljevinom, homogenizovan i uređen u haldu. Biosurfaktant "Biosolve" tipa je dodat na haldu. Biomasa i hranljive supstance su dodavane jednom mesečno prevrtanjem i mešanjem halde, dok su mešanje i aeracija halde rađena dva puta nedeljno pomoću mehanizacije. Međutim, predmet ove doktorske disertacije su rezultati

ogleda prirodne, nestimulisane biodegradacije dobijeni analizom uzoraka koji su obeleženi M1k-M5k i koji su uzeti iz kontrolne gomile, kontaminiranog zemljišta kojem nije dodavana piljevina, biomasa, nutrijenti i biosurfaktanti. Tokom šestomesečnog perioda (septembar 2009 – mart 2010.) uzorci M1k-M5k su uzimani pet puta.

Višestepena *in situ* bioremedijacija izdani kontaminirane naftnim derivatima

U ovoj studiji je učinjen pokušaj da se izvede efikasnija razgradnja onih jedinjenja u zagađivačima naftnog tipa koja su se u dosadašnjim pokušajima simulirane biodegradacije u laboratoriji sa zimogenim mikroorganizmima, *in situ* biodegradacije, ili pak u *ex situ* uslovima, pokazala kao najotpornija na dejstvo mikroorganizama. U ovom ispitivanju je po prvi put primenjena višestepena *in situ* bioremedijacija, nastala kao kombinacija filtraciono-adsorpcione remedijacione tehnike, kao i *in situ* bioremedije. Naftni zagađivač iz površinskih voda, kao i zemljišta koje je bilo u konatktu sa površinskim vodama je tretiran u periodu od dva meseca. Naftni zagađivač je prvo izdvojen prirodnim neorganskim hidrofobnim adsorbensima, a zatim je podvrgnut *in situ* bioremedijaciji. U posebnom bioreaktoru, prirodni biodegradacioni procesi su ubrzani dodatnom aeracijom, biostimulacijom i bioaugmentacijom. U toku perioda od dva meseca, uzorci su uzimani tri puta, na početku eksperimenta, a zatim jednom mesečno.

U prva tri ispitivanja nakon izolovanja ekstrakta ekstrakcijom po Sokletu sa hloroformom, dobijeni ekstrakti su frakcionisani na koloni napunjenom sa Al_2O_3 i SiO_2 . Eluiranjem sa rastavračima različite polarnosti dobijene su frakcije zasićenih ugljovodonika, aromata, alkohola i masnih kiselina. Navedene frakcije su eluirane sa heksanom, dihlormetanom, smešom dihlormetana i metanola (1:1) i 5% sumpornom kiselinom u metanolu. U poslednjem ispitivanju, dobijeni ekstrakti su eluiranjem sa petrol-etrom, benzenom i smešom hloroforma i metanola razdvojene u tri frakcije. Na taj način su dobijene frakcije zasićenih ugljovodonika, aromata i NSO jedinjenja. Pojedine frakcije u svim studijama su analizirane gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS). Analizom rezultata dobijeni su različiti podaci o uticaju bioremedijacionih uslova na biodegradaciju zasićenih i aromatičnih ugljovodonika u zagađivačima naftnog tipa.

4. EKSPERIMENTALNI DEO I REZULTATI

4.1. Simulirana biodegradacija u laboratoriji

U ovoj studiji je ispitivan bioremedijacioni potencijal aerobnih zimogenih mikroorganizama izolovanih iz zemljišta pored otpadnog kanala u blizini naftne rafinerije Pančevo. Smeša parafinskih nafti sličnog sastava, kao i nafta iz kanala je korišćena kao supstrat za zimogene mikroorganizme. Laboratorijski eksperimenti su zaustavljeni nakon 15, 30, 45, 60 i 75 dana sterilizacijom uzoraka. Kontrolni uzorak koji nije sadržao mikroorganizme je sterilisan nakon 75 dana. Organska supstanca iz uzoraka je ekstrahovana hloroformom, frakcionisana hromatografijom na koloni i analizirana gasnohromatografsko-masenospektrometrijski (GC-MS). Rezultati ove studije su detaljno prikazani u doktorskoj disertaciji dr Mile Ilić.¹¹¹

4.1.1. Primenjeni konzorcijumi mikroorganizama

Zimogeni mikroorganizmi su izolovani iz uzoraka zemljišta uzetog u blizini kanala koji se nalazi na jugu industrijske zone Pančevo. Na istoj lokaciji se nalazi i naftna rafinerija. Iz konzorcijuma zimogenih mikroorganizama izolovanih iz uzoraka zemljišta najbrojnije su bile bakterije iz roda *Bacillus* i *Aktinomicete*, dok je od gljiva najzastupljeniji bio rod *Penicillium*. Mikroorganizmi su izolovani zasejavanjem 1g zemljišta u 100 cm³ sterilnog mineralnog medijuma na 25 °C. Mineralni medijum je pripremljen rastvaranjem 1,5 g NH₄Cl; 0,55 g KH₂PO₄; 0,25 g Na₂HPO₄; 0,25 g MgSO₄ 7H₂O i 5cm³ TSSa (Trace Salts Solution) smeše u 1 dm³ destilovane vode. TSS smeša se sastojala od: 500 mg dm⁻³ Na₂EDTA x 2H₂O; 200 mg dm⁻³ FeSO₄ 7H₂O; 30 mg dm⁻³ H₃BO₃; 20 mg dm⁻³ CoCl₂ 6H₂O; 10 mg dm⁻³ ZnSO₄ 7H₂O; 3 mg dm⁻³ MnSO₄ H₂O; 3 mg dm⁻³ Na₂MoO₄ 2H₂O; 2 mg dm⁻³ NiSO₄ 7H₂O; 1 mg dm⁻³ CuCl₂ 2H₂O i 1 cm³ NaOH, *c* = 10 mol dm⁻³.

4.1.2. Ispitivana nafta

U ovoj studiji korišćene su smeše parafinskih nafti, koje su pažljivo odabrane da budu slične po sastavu sa naftnim zagađujućim supstancama koje su prethodno identifikovane u vodama kanala. Svi eksperimenti su izvođeni pod uslovima koji su slični prirodnim, budući

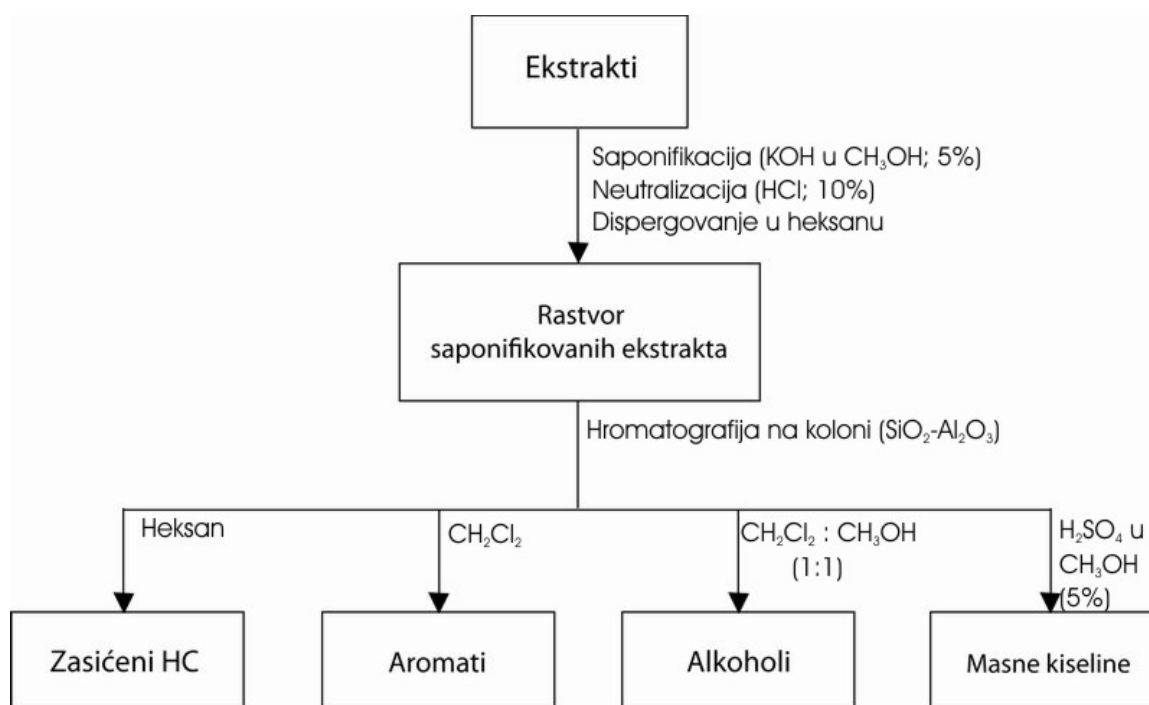
da efikasnost bioremedijacije pored karaktera prisutne mikrobiološke zajednice, zavisi i od sastava naftnih zagađujućih supstanci, i od uslova koji vladaju u zagađenom lokalitetu.

4.1.3. Primenjeni uslovi biodegradacije

U cilju procene biodegradacionih sposobnosti mikroorganizma, rastvor mineralnog medijuma sa mikroorganizmima je dodat sirovoj nafti u koncentraciji sličnoj postojećoj u otpadnom kanalu ($100\mu\text{l}/100\text{cm}^3$). Eksperimenti simulirane biodegradacije su zaustavljeni nakon 15, 30, 45, 60 i 75 dana sterilizacijom na $120\text{ }^\circ\text{C}$ u toku od 25 minuta. Kontrolni uzorak je sadržavao mineralni medijum bez mikroorganizama zajedno sa smešom različitih nafti. Kontrolni uzorak je sterilisan nakon 90 dana. Organska supstanca iz ukupno 6 uzoraka je ekstrahovana hloroformom (HPLC, J.T., USA)

4.1.4. Određivanje grupnog sastava u izolovanim ekstraktima

Nakon izolovanja ekstrakta izvršeno je njihovo frakcionisanje. Uzorci su saponifikovani sa 5% rastvorom KOH u metanolu, i neutralizovani (nakon stajanja preko noći) sa 10% HCl. Dobijeni produkti su rastvoreni u smeši dihlormetana (koja sadrži 1% metanola) i heksana (1:40), a zatim su pojedinačno frakcionisani na hromatografskoj koloni koja je napunjena sa Al_2O_3 i SiO_2 . Frakcija zasićenih ugljovodonika, aromatska frakcija, alkoholna frakcija i frakcija masnih kiselina su eluirane sa heksanom, dihlormetanom, smešom dihlormetana i metanola (1:1) i 5% sumpornom kiselinom u metanolu. Postupak frakcionisanja prikazan je na slici 15.



Slika 15. Šema po kojoj je izvršeno frakcionisanje ekstrakata.

Tokom frakcionisanja uzoraka korišćen je višefazni postupak.

Faza saponifikacije

U odmerenu količinu ekstrakta dodato je 500 μ l 5% rastvora KOH-a u metanolu (sa 1% H₂O₂). Rastvor je ostavljen preko noći na sobnoj temperaturi.

Faza neutralizacije

Nakon stajanja, u rastvor je dodato oko 130 μ l rastvora HCl (10%). Celokupna smesa je prenetu pomoću rastvarača CH₂Cl₂ – CH₃OH (1:1) u staklenu posudu od oko 40 cm³. Rastvarač i voda su uklonjeni u struji azota. Dodato je još oko 500 μ l CH₂Cl₂ sa 1% CH₃OH, i oko 20 ml *n*-heksana. Po potrebi je dodavana i određena količina Na₂SO₄ za sušenje.

Hromatografsko razdvajanje

Na dno staklene kolone prečnika oko 1 cm, postavljen je prvo mali teflonski filter. Iznad njega unesen je postupkom “na mokro” sloj adsorbensa Al₂O₃ (“basic”, 4% H₂O) u visini od oko 13 mm; iznad Al₂O₃ smese, sloj SiO₂ (prethodno aktiviran na 250 °C, a zatim dodato oko 10% H₂O) u visini od oko 33mm;

Celokupna količina je prenesena kvantitativno na vrh adsorpcionog stuba; prva frakcija (zasićeni ugljovodonici) eluirana je sa oko 10 cm³ *n*-heksana; druga frakcija (aromati) je eluirana sa oko 10 cm³ CH₂Cl₂; treća frakcija (polarna “alkoholna” frakcija)

eluirana je sa 10 cm³ smese CH₂Cl₂ i CH₃OH (1:1), i četvrta frakcija (“masne kiseline”) eluirana je pomoću rastvora H₂SO₄ u CH₃OH, i to u 4 navrata sa po 2 cm³, sa pauzama od oko 20 minuta;

Iz prve tri frakcije je uklonjen rastvarač u struji azota;

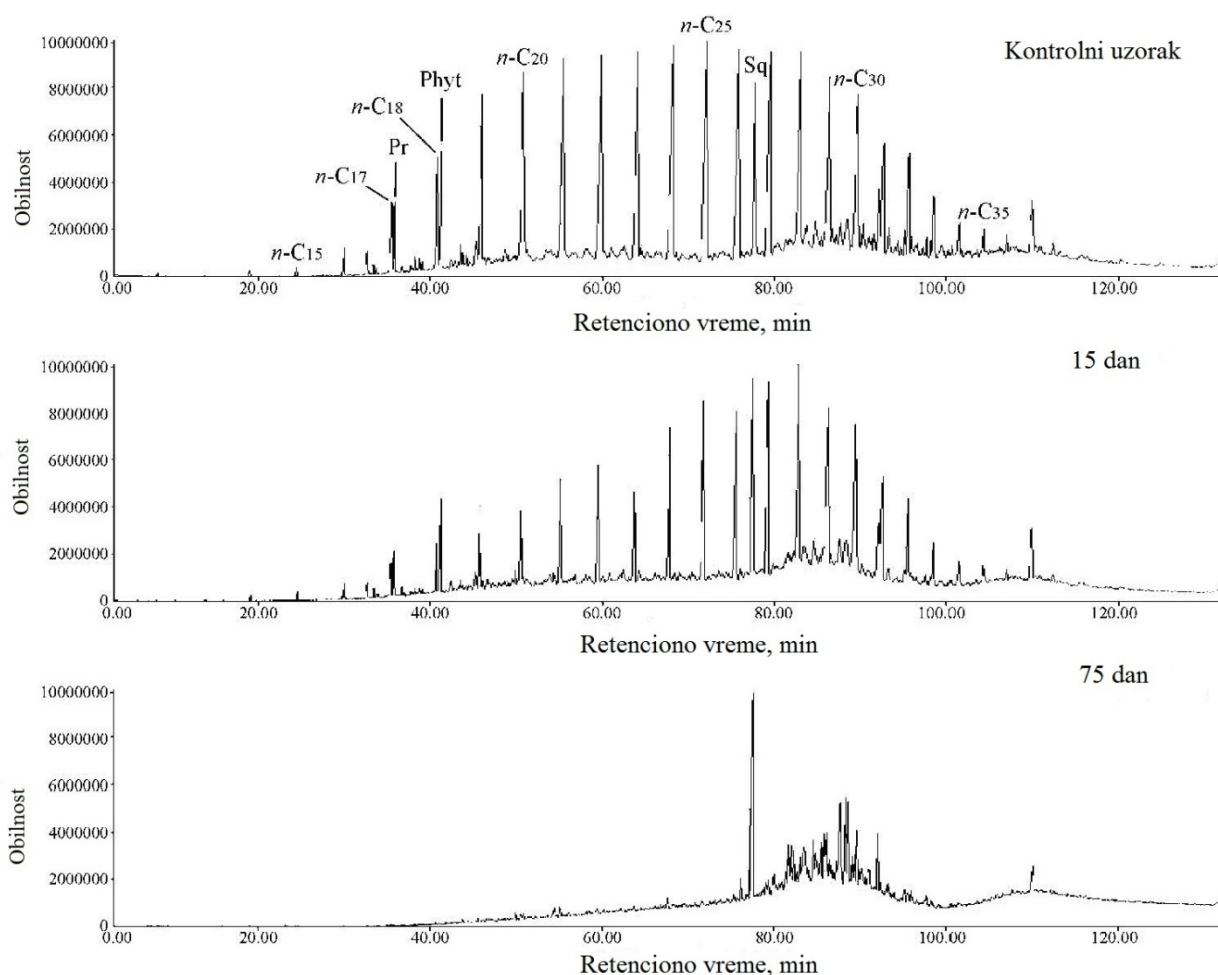
U rastvor četvrte frakcije dodato je oko 30 cm³ vodenog rastvora NaCl (20%) i 2 cm³ *n*-heksana. Organski deo se izdvojio pipetom nakon jakog mućkanja; postupak dodavanja *n*-hesana je ponavljan nekoliko puta; na kraju je uklonjen *n*-heksan u struji azota.

4.1.5. Analiza izolovanih frakcija primenom instrumentalnih tehnika

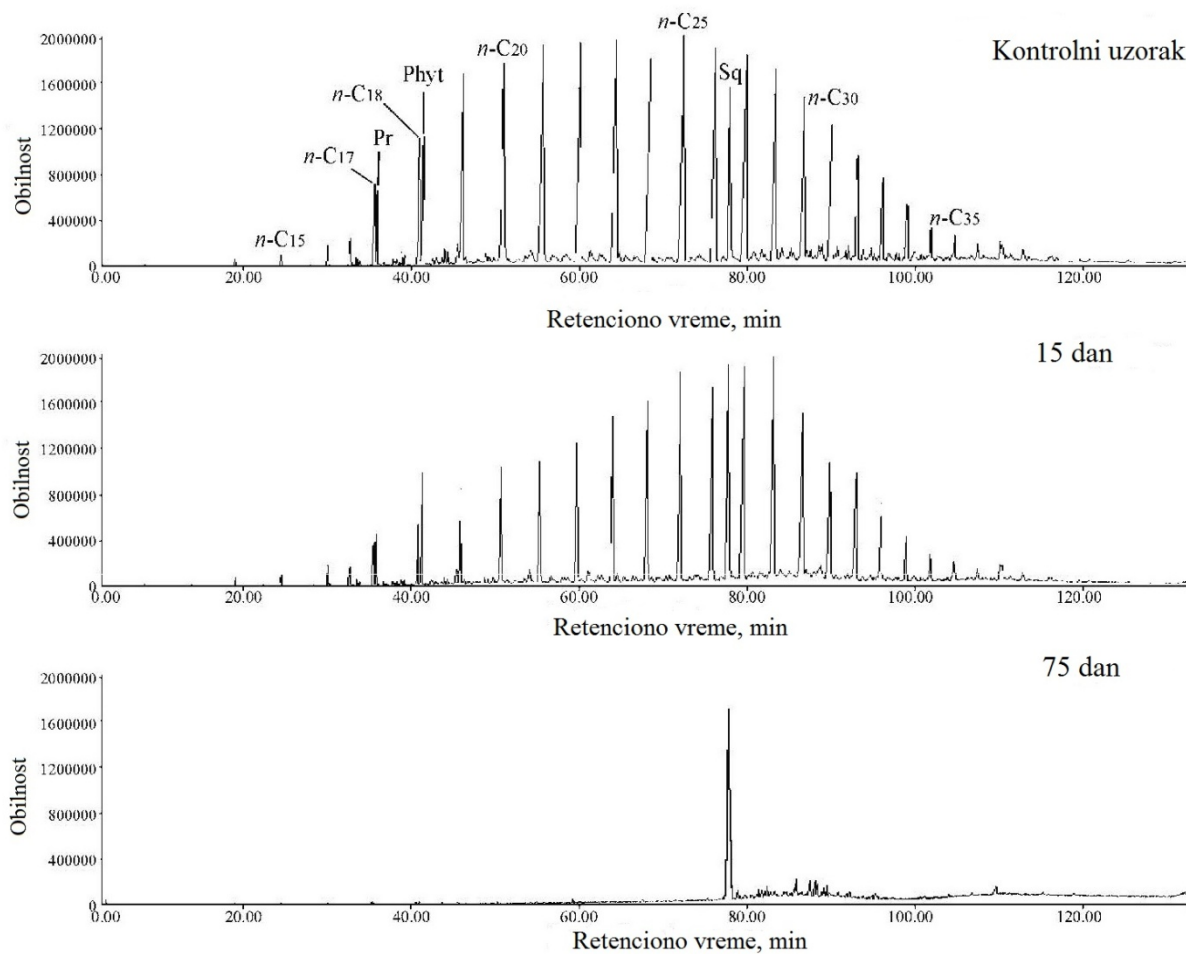
Izolovani ugljovodonici su analizirani GC-MS tehnikom. Analize su rađene na gasnom hromatografu Agilent 7890N sa HP5-MS kapilarnom kolonom (temeperaturni opseg: 80 °C za 0 minuta, zatim 2 °C min⁻¹ do 300 °C i onda održavano 20 minuta). Helijum je korišćen kao noseći gas (protok 1 cm³ min⁻¹). Gasni hromatograf je bio spojen sa masenim spektrometrom Hewlett-Packard 5972 (energija jonizujućih elektrona 70eV u opsegu skeniranja 45-550). Preliminarne analize ispitivanih uzoraka su rađene u full scan režimu. Detaljne analize željenih jedinjenja su izvedene u single ion monitoring (SIM) režimu. *n*-Alkani i izoprenoidi su identifikovani na osnovu fragmentograma jona *m/z* 57, sterani na osnovu fragmentograma jona *m/z* 217, triterpani na osnovu fragmentograma jona *m/z* 191, fenantren na osnovu fragmentograma jona *m/z* 178, metil-fenantreni na osnovu fragmentograma jona *m/z* 192 i dimetil-fenantreni na osnovu fragmentograma jona *m/z* 206. Najvažniji pikovi su identifikovani poređenjem retencionih vremena sa podacima iz organske geohemijske literature ili, pak, pomoću ukupnog masenog spektra koristeći bazu podataka masenih spektara (NIST/EPA/NIH biblioteku masenih spektara NIST2000, Wiley/NBS registar masenih spektara 7 edicija, elektronsko izdanje). *n*-Alkani i izoprenoidi pristan i fitan su kvantitativno određeni prema skvalenu (Supelco) kao internom standardu. Fenantren, metil-fenantreni i dimetil-fenantreni su kvantitativno određeni prema fenantrenu-d10 (Supelco) kao internom standardu.

4.1.6. Pregled dobijenih rezultata

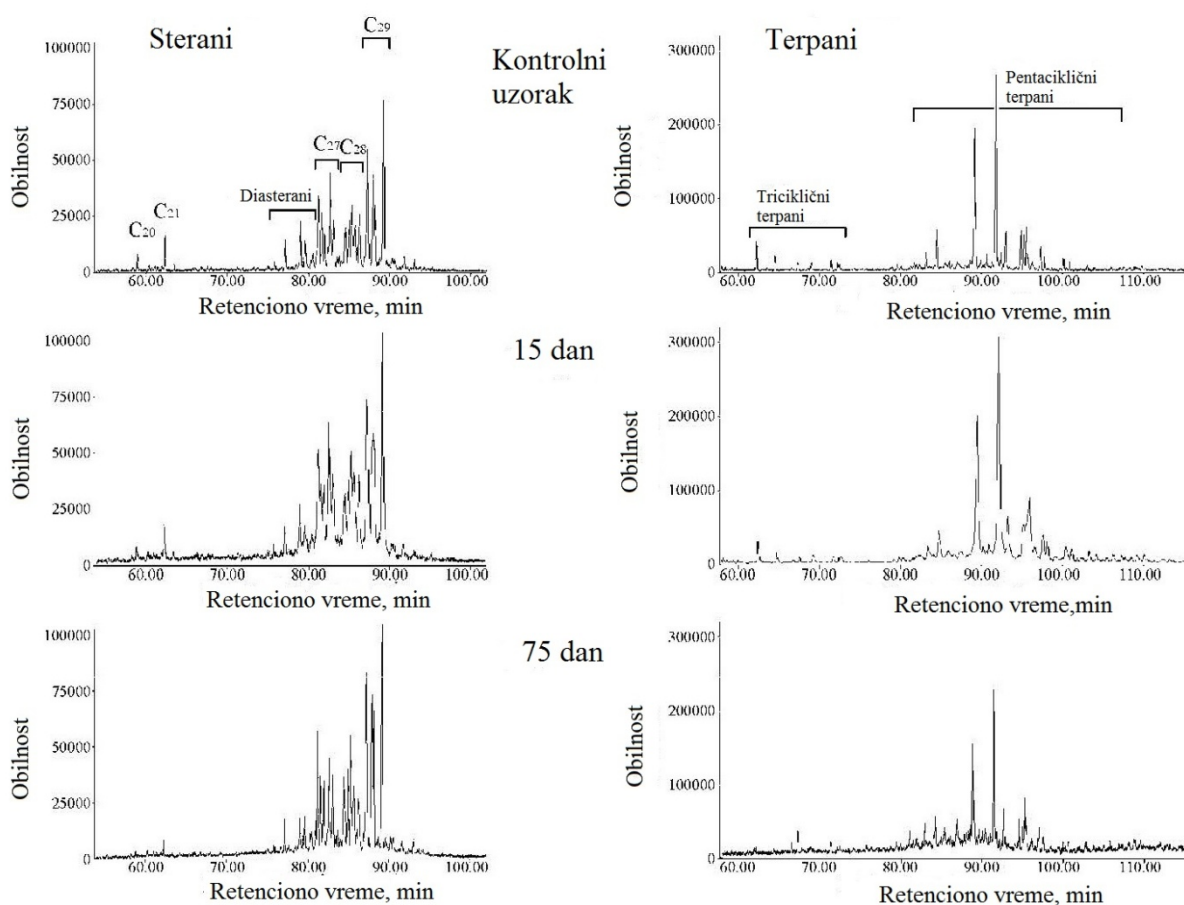
Zasićeni ugljovodoni - ukupni jonski hromatogram (Total ion chromatograms, TIC) frakcije zasićenih ugljovodonika iz kontrolnog uzorka, kao i ukupni jonski hromatogrami uzoraka nakon 15 i 75 dana eksperimenta su prikazani na slici 16. Fragmentogrami *n*-alkana i izoprenoida u ispitivanim uzorcima prikazani su na slici 17. GC-MS jonski hromatogrami sterana i terpana su prikazani na slici 18. U tabeli 4. predstavljeni su najvažniji biodegradacioni parametri koji se izračunavaju iz raspodela *n*-alkana i izoprenoidnih alifatični ugljovodonika.



Slika 16. Ukupni jonski hromatogrami (TIC) frakcija zasićenih ugljovodonika izolovanih iz ekstrakta kontrolnog uzorka, kao i iz uzoraka tokom bioremedijacionog eksperimenta nakon 15 i 75 dana (Pr -pristan; Phyt -fitan; Sq - skvalen).¹¹¹



Slika 17. GC-MS jonski fragmentogrami *n*-alkana i izoprenoida (m/z 57) iz ugljovodonične frakcije izolovane iz ekstrakta kontrolnog uzorka, kao i iz uzoraka tokom bioremedijacionog eksperimenta nakon 15 i 75 dana.¹¹¹



Slika 18. GC-MS jonski fragmentogrami sterana (m/z 217) i terpana (m/z 191) iz ugljovodonične frakcije izolovane iz ekstrakta kontrolnog uzorka, kao i iz uzorka tokom bioremedijacionog eksperimenta nakon 15 i 75 dana.¹¹¹

Tabela 4. Biodegradacioni parametri izračunati iz raspodele i obilnosti n -alkana i izoprenoida pristana i fitana u kontrolnom uzorku i u uzorcima tokom eksperimenta biodegradacije.¹¹¹

Trajanje eksperimenta u danima	Opseg n -alkana	Pr/ n -C ₁₇	Phyt/ n - C ₁₈	Koncentracija n -alkana u ekstraktu (mg/g)	Razgradnja n -alkana (%)
Kontrolni uzorak	C ₁₃ -C ₄₁	0,90	1,02	61,41	-
15	C ₁₃ -C ₄₁	1,62	2,43	37,50	38,94
30	C ₁₃ -C ₄₁	2,15	3,17	23,81	61,23
45	C ₁₆ -C ₄₁	1,36	2,37	9,76	84,11

60	C ₂₆ -C ₄₁	NO ^a	NO ^a	1,00	>98,37
75	NO ^b	NO ^a	NO ^a	NO ^b	100

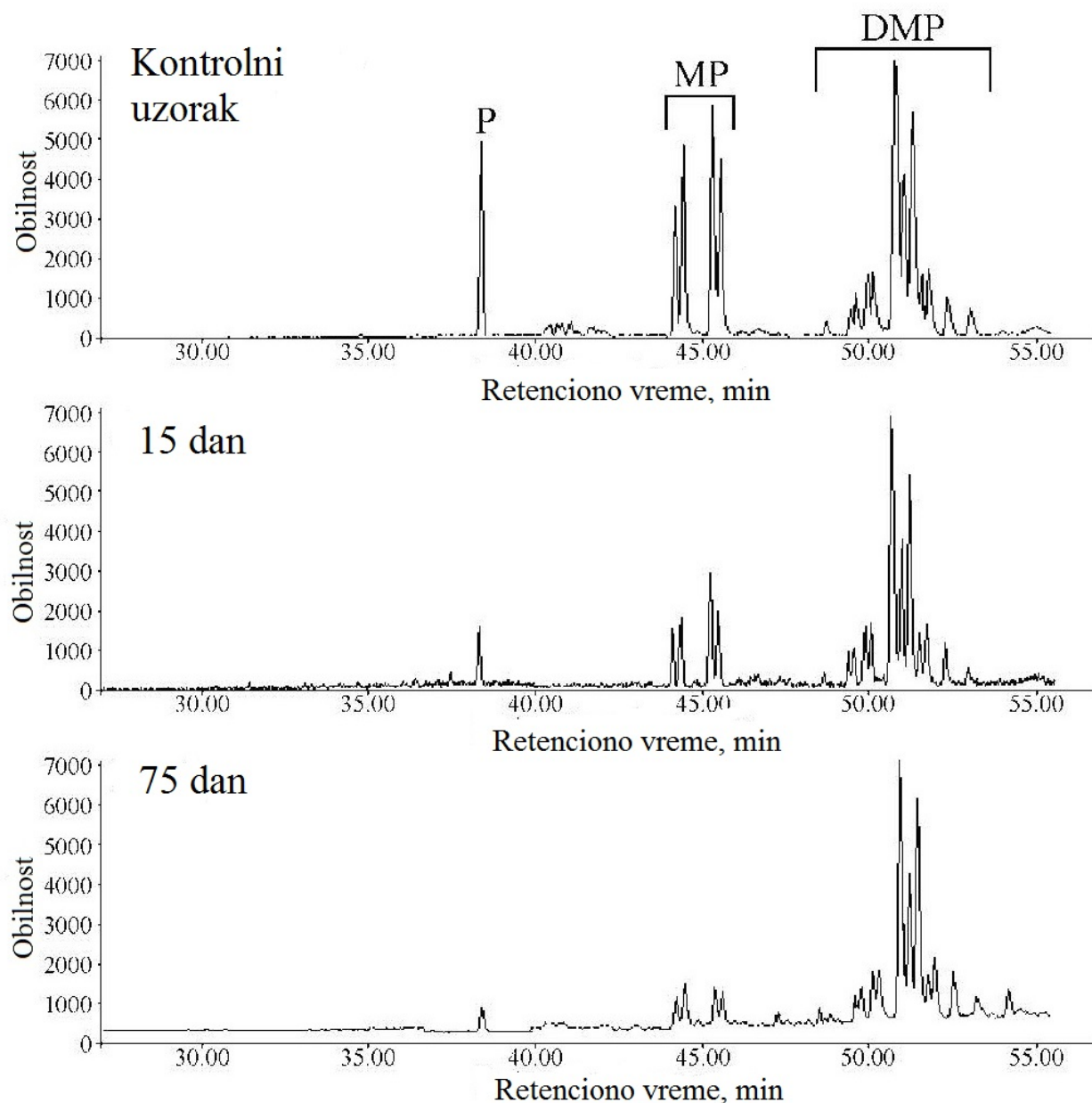
NO^a - parametar nije izračunat zbog degradacije *n*-alkana i izoprenoida;

NO^b - parametar nije izračunat zbog degradacije *n*-alkana.

Aromatični ugljovodonici – jedinjenja koja su identifikovana i kvantitativno određena u frakciji aromata bili fenantren i njegovi derivati sa jednom i dve metil grupe. Rezultati kvalitativne analize ovih jedinjenja su prikazani na slici 19. Promene u koncentraciji fenantrena, metil-fenantrena i dimetil-fenantrena su prikazane u tabeli 5.

Tabela 5. Promene u koncentraciji fenantrena, metil-fenantrena i Dimetil-fenantrena u kontrolnom uzorku i u uzorcima tokom biodegradacionog eksperimenta (P-fenantren; MP-metil-fenantreni; DMP-dimetil-fenantreni).¹¹¹

Trajanje eksperimenta	Koncentracija u ekstraktima (µg/g)			Gubici (% od kontrolnog uzorka)		
	P	MP	DMP	P	MP	DMP
Kontrolni uzorak	195,50	737,67	11940,80	-	-	-
15	74,49	388,00	1193,68	61,90	48,49	0,09
30	48,62	363,82	1173,97	75,13	50,68	1,74
45	35,93	281,70	1170,22	81,62	61,81	2,06
60	34,08	204,39	1167,35	82,57	72,29	2,30
75	33,35	186,32	1166,82	82,94	74,74	2,34



Slika 19. GC-MS jonski fragmentogrami fenantrena (P; m/z 178), metil-fenantrena (MP; m/z 192), dimetil-fenantrena (DMP; m/z 206) iz ugljovodonične frakcije izolovane iz ekstrakta kontrolnog uzorka, kao i iz uzoraka tokom bioremedijacionog eksperimenta nakon 15 i 75 dana.¹¹¹

4.2. *ex situ* Bioremedijacija – Rafinerija nafte Pančevo, maj-novembar 2006. godina

U ovom delu teze izvođeni su eksperimenti *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog naftnim zagađujućim supstancama koje je prikupljeno sa različitih lokaliteta rafinerije nafte Pančevo. Eksperimenti su izvođeni u periodu od šest meseci (maj-novembar 2006. godine). Kontaminirano zemljište je bilo pomešano sa piljevinom, estrima dugolančanih alkohola i masnih kiselina i prirodnim đubrivom. Nakon toga, zemljište je uređeno u homogenizovanu gomilu i u njoj su instalirane cevi za aeraciju i sistem za prikupljanje procedne tečnosti. Mikroorganizmi koji su izolovani iz zemljišta zagađenim naftom, umnoženi su i kao aktivna biomasa i dodavani su haldi jednom nedeljno. Uzorci su uzimani u vremenskim razmacima od dve nedelje, tako da je ukupno sakupljeno dvanaest uzorka (označeni P₁-P₁₂). Organska supstanca iz uzoraka je ekstrahovana hloroformom i frakcionisana hromatografijom na koloni. Alkoholna frakcija i frakcija masnih kiselina su analizirane gasnohromatografskom-masenospektrometrijskom (GC-MS) tehnikom. Rezultati ove studije su detaljno prikazani u doktorskoj disertaciji dr Vladimira Beškoskog.¹⁰⁵

4.2.1. Lokalitet

Eksperimenti bioremedijacije zemljišta kontaminiranog sa zagađivačem naftnog tipa su izvođeni na lokaciji naftne rafinerije Pančevo (Aluvijalna formacija reke Dunav). Približno 150 m³ kontaminiranog zemljišta je bilo prikupljeno sa pet različitih lokacija rafinerije. Prikupljen materijal je homogenizovan i raspoređen u uređenu gomilu (haldu).

4.2.2. Uslovi bioremedijacije

Eksperimenti biostimulacije, bioventilacije i reinokulacije autohtonog konzorcijuma mikroorganizama su izvođeni šest meseci. Nakon homogenizacije zemljištu je dodata piljevina (10% od ukupne zapremine) radi poboljšavanja aeracije. Prikupljenom zemljištu su dodavani estri dugolančanih alkohola i masnih kiselina kao biodegradabilni substrati (0,20 kg m⁻³) i prirodno đubrivo iz živinarske farme kao izvor azota i fosfora za biostimulaciju (približno 5%). Nakon toga zemljište je oblikovano u haldu u koju je instaliran sistem cevi za aeraciju i sistem za prikupljanje procedne tečnosti. Mešanjem zemljišta svake dve nedelje obezbeđena je homogenizacija i dodatna aeracija sadržaja halde.

4.2.3. Primenjeni konzorcijum

Titar mikroorganizama je određen zasejavanjem na agar pločama u serijama i inkubiran na 26 °C. Za bakterije je korišćen hranljivi agar, za kvasce i buđi je korišćen Sabouraud glukozni agar sa hloramfenikolom, dok je mineralni bazni medijum sa 2000 ppm dizel goriva korišćen za mikroorganizme degradatore ugljovodonika. Rast populacije mikroorganizama koji su učestvovali u biodegradaciju obezbeđen je biostimulacijom i reinokulacijom zimogenih mikroorganizama. Sojevi bakterija koji mogu da degraduju ugljovodonike su umnoženi u laboratorijskom bioreктору. 10 dm³ biomase velike gustine (do 10⁹ CFU cm⁻³) jednom nedeljno je nanošeno na haldu.

4.2.4. Ekstrakcija organske supstance u uzorcima zagađenog zemljišta

Organska supstanca je izolovana iz uzoraka P₁-P₁₂ ekstrakcijom po Soksletu sa hloroformom. Vreme ekstrakcije je iznosilo 36 sati.

Određivanje grupnog sastava u izolovanim ekstraktima

Nakon izolovanja, ekstrakti su frakcionisani. Uzorci su saponifikovani sa 5% rastvorom KOH u metanolu, i neutralizovani (nakon stajanja preko noći) sa 10% HCl. Dobijeni produkti su rastvoreni u smeši dihlormetana (koja sadrži 1% metanola) i heksana (1:40), a zatim su pojedinačno frakcionisani na hromatografskoj koloni koja je napunjena sa Al₂O₃ i SiO₂. Frakcija zasićenih ugljovodonika, aromatska frakcija, alkoholna frakcija i frakcija masnih kiselina su eluirane sa heksanom, dihlormetanom, smešom dihlormetana i metanola (1:1) i 5% sumpornom kiselinom u metanolu.

Šema po kojoj su ekstrakti frakcionisani i detaljni opis postupka dati su u prethodnom poglavlju na stranama 53 i 54.

4.2.5. Analiza izolovanih frakcija primenom instrumentalnih tehnika

Alkoholna frakcija i frakcija masnih kiselina su analizirane gasnohromatografskom-masenospektrometrijskom (GC-MS) tehnikom. Masne kiseline su detektovane kao metilestri koji su formirani tokom eluranja. Analize su vršene na gasnom hromatografu Hewlet Packard 5890 koji je bio opremljen sa SGE BPX-5 kapilarnom kolonom (30m x 0.25 mm ID x 0.25 μm df; temperaturni program 80 °C, izotermalno vreme 3 minuta, zagrevanje do 320 °C sa tempom zagrevanja 4 °C min^{-1}). Gasni hromatograf je bio spojen sa Fennigan Mat 8222 masenim spektrometron (masena rezolucija, R=1000, energija jonizujućih elektrona 70eV). Helijum je korišćen kao noseći gas (protok 1 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$). Najvažniji pikovi u hromatogramima frakcija su identifikovani pomoću totalnog masenog spektra koristeći bazu podataka masenih spektara (NIST/EPA/NIH biblioteku masenih spektara NIST2000, Wiley/NBS registar masenih spektara 7 edicija, elektronsko izdanje).

4.2.6. Pregled dobijenih rezultata

Sadržaj organske supstance u uzorcima P₁-P₁₂, kao i rezultati dobijeni hromatografskim razdvajanjem su predstavljani u tabeli 6.

Količina frakcija dobijenih hromatografskim razdvajanjem, kao i količina ostatka na koloni su prikazani u tabeli 7.

Tabela 6. Sadržaj ekstrakata u uzorcima P₁-P₁₂ i njihovi grupni sastavi.¹⁰⁵

Uzorak	Datum uzorkovanja	Ekstrakt (%)	Alkani (%)	Aromati (%)	Alkoholi (%)	Masne kiseline (%)
P ₁	10/05/2006	5,9	46,4	9,5	27,4	16,7
P ₂	24/05/2006	4,8	53,3	13,0	26,0	7,8
P ₃	12/06/2006	5,9	45,9	10,08	32,4	10,8
P ₄	28/06/2006	5,7	54,4	14,4	21,1	10,0
P ₅	12/07/2006	5,5	51,2	12,8	24,4	11,6
P ₆	26/07/2006	4,6	45,5	17,0	26,1	11,4
P ₇	14/08/2006	4,2	53,2	13,9	21,5	11,4
P ₈	30/08/2006	6,6	58,1	6,5	25,8	9,7
P ₉	13/09/2006	4,5	53,6	10,1	21,7	14,5
P ₁₀	04/10/2006	6,1	49,4	19,5	23,4	7,8

P ₁₁	19/10/2006	5,3	39,2	19,6	26,8	14,4
P ₁₂	10/11/2006	4,1	33,3	17,1	32,4	17,1

Tabela 7. Grupni sastavi ekstrakta (uključujući i ostatak na koloni).¹⁰⁵

Uzorak	Alkani (%)	Aromati (%)	Alkoholi (%)	Masne kiseline (%)	Ostatak na koloni (%)
P ₁	37,1	7,6	21,9	13,3	20,0
P ₂	38,7	9,4	18,9	5,7	27,4
P ₃	32,7	7,7	23,1	7,7	28,8
P ₄	47,6	12,6	18,4	8,7	12,6
P ₅	41,5	10,4	19,8	9,4	18,9
P ₆	38,8	14,6	22,3	9,7	14,6
P ₇	40,8	10,6	16,5	8,7	23,4
P ₈	35,3	3,9	15,7	5,9	39,2
P ₉	33,3	6,3	13,5	9,0	37,8
P ₁₀	34,9	13,8	16,5	5,5	29,4
P ₁₁	35,0	17,5	23,9	12,9	10,7
P ₁₂	32,4	16,7	31,5	16,7	2,8

4.3. *ex situ* Bioremedijacija – zemljište zagađeno mazutom, septembar 2009 – mart 2010. godina

U delu teze izvođeni su eksperimenti *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom. Kontaminirano zemljište je iskopano sa lokaliteta elektrane koje je oko godinu dana bilo zagađivano mazutom iz rezervoara elektrane. Kontaminirano zemljište je bilo pomešano sa piljevinom i peskom, i uređeno u homogenizovanu gomilu. Na svaki kubni metar kontaminiranog zemljišta je dodato oko 70 ml rastvora biosurfaktanta Bioslve tipa. Tokom perioda od šest meseci (septembar 2009 – mart 2010.) halda je kontinuirano tretirana konzorcijumom mikroorganizama i hranljivim materijama radi stimulacije mikroorganizama. Konzorcijum mikroorganizama je izolovan iz zemljišta zagađenim mazutom, umnožen je i kao aktivna biomasa aplikovan na haldi (reinokulacija). Pre dodavanja piljevine i biosurfaktanata oko 10 m³ pomešanog materijala koji se sastojao od zemljišta kontaminiranog mazutom i neispranog peska je izdvojeno u kontrolnu gomilu. Međutim, predmet ove doktorske disertacije su rezultati dobijeni tokom oglada nestimulisane biodegradacije zemljišta zagađenog mazutom kome nisu dodavani piljevina, biomasa, hranljive materije i biosurfaktanti. Organska supstanca iz uzoraka je izolovana ekstrakcijom po Soksletu, frakcionisana hromatografijom na koloni i analizirana gasnohromatografsko-masenospektrometrijski (GC-MS).

4.3.1. Uzorak

Iz zemljišta elektrane je približno iskopano 150 tona, odnosno 210m³ zemljišta zagađenog mazutom. Kontaminirano zemljište je kontinuirano raspodeljeno preko 300m³ neispiranog peska iz reke Save. Oko 10 m³ pomešanog materijala je izdvojeno u kontrolnu gomilu i raspodeljeno preko asfaltne vodonepropusne podloge. Prvi uzorak (M1k) je uzet na početku eksperimenta, nakon mešanja kontaminiranog zemljišta sa peskom. Tokom šestomesečnog perioda uzorci M1k-M5k su uzimani pet puta (07/09/2009, 06/10/2009, 09/11/2009, 12/01/2010, 18/03/2010).

4.3.2. Primenjeni uslovi

Nakon formiranja, kontrolna gomila je izolovana od ostatka kontaminiranog zemljišta, kojem su dodani piljevina i biosurfaktanti i koje je, nakon toga, uređeno u haldu. Nasuprot haldi koja je tokom trajanja eksperimenta periodično prskana biomasom sačinjenom od umnoženih mikroorganizma i hranljivih materija za mikroorganizme koje su sačinjavali rastvori neorganskih soli, kontrolna gomila nije dodatno tretirana, niti je kao kod halde vršena aeracija mešanjem i prevrtanjem zemljišta pomoću poljoprivredne mehanizacije. Nasuprot halde na kojoj su izvođeni ogledi bioremedijacije, u kontrolnoj gomili su se odigravali prirodni biodegradacioni procesi. Prosečna dnevna temperatura tokom šestomesečnog eksperimenta iznosila je oko 7,5 °C, u opsegu od -2,3 °C do 23,5 °C.

4.3.3. Primenjeni konzorcijum

Iz zemljišta kontaminiranog mazutom su na osnovu testova (API-Biomerieux) identifikovane sledeće kulture mikroorganizama: *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas luteola*, *Achromobacter denitrificans*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Aeromonas hydrophilia*.

4.3.4. Ekstrakcija organske supstance u uzorcima zagađenog zemljišta

Organska supstanca iz ukupno deset uzoraka je ekstrahovana hloroformom (HPLC, J.T., USA) ekstrakcijom u aparaturi po Soksletu. Nakon toga ekstrakti su razdvojeni u različite frakcije hromatografijom na koloni.

4.3.5. Određivanje grupnog sastava u izolovanim ekstraktima

Nakon izolovanja ekstrakta izvršeno je njihovo frakcionisanje. Uzorci su saponifikovani sa 5% rastvorom KOH u metanolu i neutralizovani (nakon stajanja preko noći) sa 10% HCl. Dobijeni produkti su rastvoreni u smeši dihlormetana (koja sadrži 1% metanola) i heksana (1:40), a zatim su pojedinačno frakcionisani na hromatografskoj koloni koja je napunjena sa Al₂O₃ i SiO₂. Frakcija zasićenih ugljovodonika, aromatska frakcija,

alkoholna frakcija i frakcija masnih kiselina su eluirane sa heksanom, dihlormetanom, smešom dihlormetana i metanola (1:1) i 5% sumpornom kiselinom u metanolu.

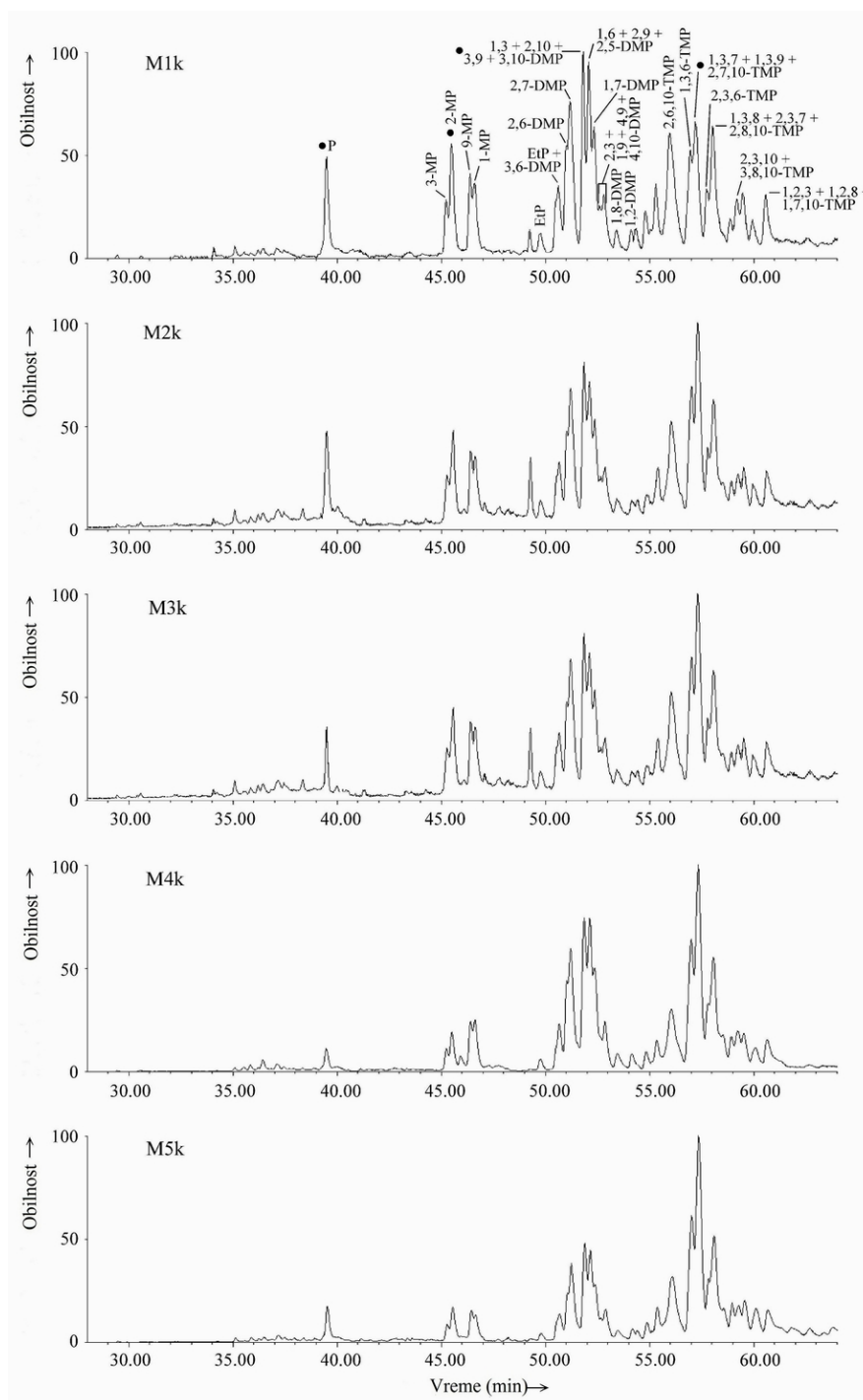
Šema po kojoj su ekstrakti frakcionisani i detaljni opis postupka dati su u na stranama 53 i 54.

4.3.6. Analiza aromatične frakcije GC-MS tehnikom

Aromatična frakcija je analizirana gasnohromatografskom-masenospektrometrijskom (GC-MS) tehnikom. Analize su rađene na gasnom hromatogramu Agilent 7890N sa HP5-MS kapilarnom kolonom (temperaturni opseg: 80 °C za 0 minuta, onda 2 °C min⁻¹ do 300 °C i onda održavano 20 minuta) u kojoj je helijum korišćen kao noseći gas (protok 1 cm³ min⁻¹). Gasni hromatograf je bio spojen sa Hewlett-Packard 5972 MSD koji je upravljao na 70eV u opsegu skeniranja 45-550. Preliminarne analize ispitivanih uzoraka su izvršene u punom režimu skeniranja. Detaljne analize željenih jedinjenja su izvedene u režimu pojedinačnog monitoring jona (SIM) uključujući sledeće jonske hromatograme: m/z 178 (fenantren), 192 (metil-fenantreni), 206 (dimetil-fenantreni) i 220 (trimetil-fenantreni). Pikovi fenantrena, metil-fenantrena i dimetil-fenantrena su identifikovani prema podacima iz organske geohemijske literature, ili pomoću totalnog masenog spektra koristeći bazu podataka masenih spektara (NIST/EPA/NIH biblioteku masenih spektara NIST2000, Wiley/NBS registar masenih spektara 7 edicija, elektronsko izdanje). Pikovi trimetil-fenantrena su označeni korišćenjem pretpostavljenog redosleda eluiranja po Stojanoviću. Fenantrenski i alkil-fenantrenski parametri su izračunati iz GC-MS hromatograma pomoću softvera GC-MS Data Analysis.

4.3.7. Pregled dobijenih rezultata

Maseni fragmentogrami fenantrena, metil-fenantrena, dimetil-fenantrena i trimetil-fenantrena dobijenih gasnohromatografskom-masenospekopskim analizama aromatične frakcije uzoraka M1k-M5k su prikazani na slici 24. Pikovi koji su korišćeni za izračunavanja parametara su obeleženi tamnim tačkama na slici 24. Opis oznaka sa slike 24 data su u tabeli 8.

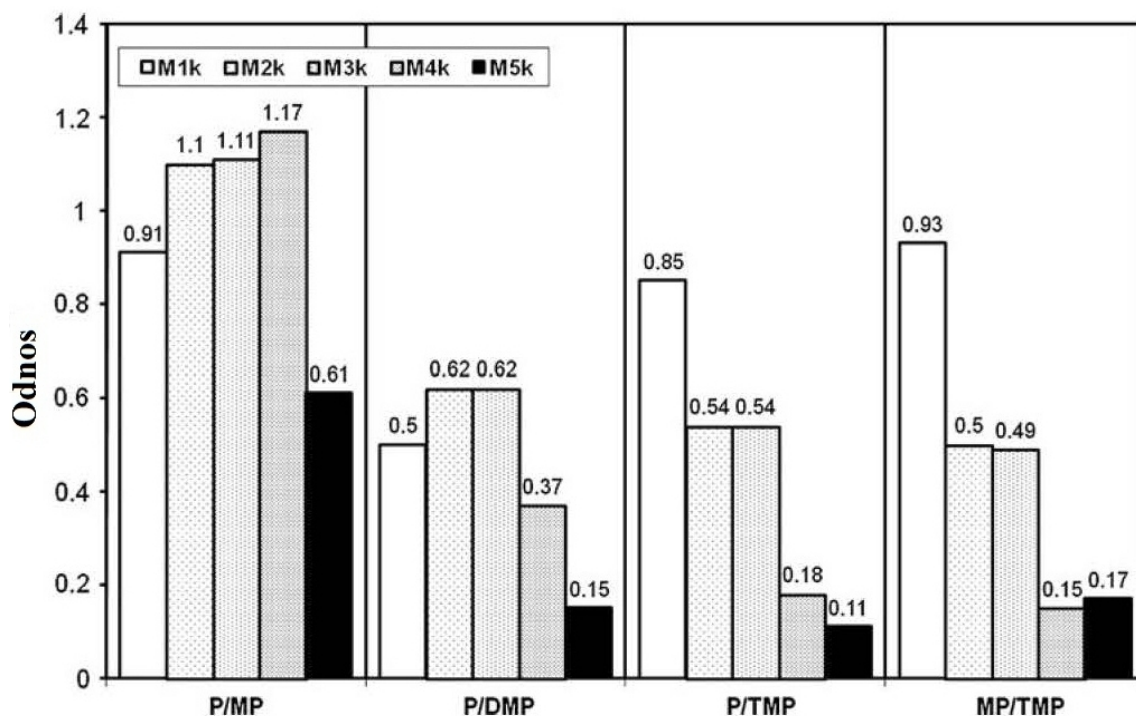


Slika 20. Maseni fragmentogrami fenantrena (P; m/z 178), metil-fenantrena (MP; m/z 192), dimetil-fenantrena (DMP; m/z 206) i trimetil-fenantrena (TPM, m/z 220) dobijeni GC-MS uzoraka M1k-M5k.

Tabela 8. Opis oznaka sa slike 20.

Oznaka	Identifikacija
P	Fenantren
3-MP	Metil-fenantren (MP)
2-MP	
9-MP	
1-MP	
Et-P	Etil-fenantreni (EtP) i dimetil-fenantreni (DMP)
EtP + 3,6-DMP	
2,6-DMP	
2,7-DMP	
1,3- + 2,10 + 3,9 + 3,10-DMP	
1,6 + 2,9 + 2,5-DMP	
1,7-DMP	
2,3 + 1,9 + 4,9 + 4,10-DMP	
1,8-DMP	
1,2-DMP	
2,6,10-TMP	Trimetil-fenantreni (TMP)
1,3,6-TMP	
1,3,7 + 1,3,9 + 2,7,10-TMP	
2,3,6-TMP	
1,3,8 + 2,3,7 + 2,8,10-TMP	
2,3,10 + 3,8,10-TMP	
1,2,3 + 1,2,8 + 1,7,10-TMP	

U ovim ogledima ispitivane su promene u raspodeli fenantrena i njegovih metil izomera. Tom prilikom su izračunati odnosi koncentracija fenantrena i najobilnijih metil-fenantrena, dimetil-fenantrena i trimetil-fenantrena. Takođe su izračunati odnosi koncentracija metil-fenantrena i trimetil-fenantrena. Ti odnosi za uzorke M1k-M5k su prikazani na slici 21.



Slika 21. Odnosi fenantrena (P) i najintenzivnijih metil-fenantrena (MP), dimetil-fenantrena (DMP) i trimetil-fenantrena (TPM), kao i odnosi MP i TMP uzoraka M1k-M5k.

4.4. Višestepena *in situ* bioremedijacija izdani kontaminirane naftnim derivatima

Površinske vode koje se nalaze na lokalitetu kompanije Niteks-Benetton su kontinuirano bile kontaminirane naftnim zagađivačem. Naftni zagađivač su sačinjavali naftni derivati koji su cureli iz tankova za skladištenje u periodu od nekoliko godina. Površinske vode koje su sadržavale rastvorne ugljovodonike, kao i plutajući sloj naftnog zagađivača, LNPL (light non aqueous phase liquid) su tretirane filtraciono-adsorpcionom remedijacionom tehnikom, kao i *in situ* bioremedijacijom. Kombinacija ove dve tehnike je originalna ideja koja je prvi put primenjena u ovom eksperimentu. Eksperimenti višestepene *in situ* bioremedijacije su izvođeni u periodu od dva meseca (maj-jul 2012. godine). Uzorci su uzimani na početku eksperimenta, nakon mesec dana i na kraju eksperimenta.

4.4.1. Uslovi bioremedijacije

Naftni zagađivač iz površinskih voda, kao i zemljišta koje je bilo u konatktu sa površinskim vodama prvo je izolovano filtraciono-adsorpcionom remedijacionom tehnikom, koristeći kolone sa prirodnim neorganskim hidrofobnim adsorbensima u posebnoj eksternoj jedinici. Nakon izdvajanja, naftni zagađivač je podvrgnut *in situ* bioremedijaciji. *In situ* bioremedijacija je izvođena pomoću hemijske i biološke stimulacije, augmentacije i aeracije u zatvorenom bipolarnom sistemu sa eksternom adsorpcionom jedincom. Prirodni mikrobiološki procesi su dodatno stimulisani bioaugmentacijom i dodatnom aeracijom. Bioaugmentacija je postignuta injektiranjem biomase koju su sačinjavali mikroorganizmi koji su izolovani iz tretiranih površinskih voda. Dodatna aeracija je vršena pomoću kompresora ili dodavanjem hemijskih generatora molekuskog kiseonika pomoću odgovarajućeg uređaja. Bistimulacija je vršena dodavanjem rastvora hranljivih materija. Višestepena *in situ* bioremedijacije bazirana na principu bipolarnog modela, sa zatvorenim sistemom kruženja vode, pri čemu se kontaminirano voda preuzima, prečišćava i ponovo vraća u sredinu iz koje je preuzeta.

4.4.2. Određivanje grupnog sastava u izolovanim ekstraktima

U toku trajanja eksperimenta višestepena *in situ* bioremedijacije uzorci su uzimani tri puta. Rastvorna organska supstanca iz uzoraka je izolovana ekstrakcijom. Dobijeni ekstrakti su frakcionisani u tri frakcije, frakciju zasićenih ugljovodonika, frakciju aromata i frakciju NSO jedinjenja hromatografijom na koloni. Frakcije se eluiraju prema rastućoj polarnosti. Prvo se eluira nepolarna frakcija zasićenih ugljovodonika pomoću petroletra, zatim, polarnija aromatska frakcija pomoću benzena. Na kraju, se eluira najpolarnija frakcija NSO jedinjenja pomoću polarne smeše metanola i hloroforma.

Hromatografski stub formira se u staklenoj koloni s teflonskom slavinom. Kao adsorbensi koriste se silika-gel, neutralni (Merck), granulacije 70-230 mesh-a i aluminijum-oksidi (Merck), granulacije 70-230 mesh-a koji su prethodno aktivirani na 105 °C u toku dva sata. Količine adsorbensa iznose 2,25g SiO₂ i 1,65g aluminijum oksida na 10 mg uzorka. Na dno kolone stavi se komadić vate koja se odmasti propuštanjem petrol-etra kroz kolonu. Nakon toga, unošenjem u kolonu suspenzije silika gela u petrol-etru, formira se adsorpcioni stub. Zatim se unosi aluminijum-oksidi koji se pažljivo spira s kolone petrol-etrom. Kada je hromatografski stub formiran, na vrh stuba nanosi se uzorak. Uzorak se za kolonu tako

pripremi da se ekstrakt iz vegeglasa rastvori u što manjoj zapremini azeotropne smeše. Rastvoru se doda silika-gel. Vegeglas se ostavi kako bi rastvarač ispario u struji vazduha, a homogena smeša uzorka i silika gela prenosi se na vrh hromatografskog stuba. Kao recipijenti frakcija koriste se tri balona od po 250 ml. Prva frakcija nepolarnih ugljovodonika eluira se s petrol-etrom, druga frakcija aromatskih ugljovodonika eluira se benzenom, a treća frakcija, NSO jedinjenja eluira se pomoću smeše hloroforma i metanola u odnosu 1:1. Zapremine eluenata za 10 mg uzorka iznose:

1. petrol-etar 22,5 ml;
2. benzen 37,5 ml i
3. hloroform-metanol 50 ml

Najveće količine upotrebljenih rastvarača uklanjaju se iz balona pomoću rotacionog vakum uparivača. Frakcije se kvantitativno prenose u vegeglase kojima je prethodno određena masa. Vegeglasi se ostave duže vremena da stoje kako bi poslednji tragovi rastvarča isparili.

4.4.3. Analiza izolovanih frakcija primenom instrumentalnih tehnika

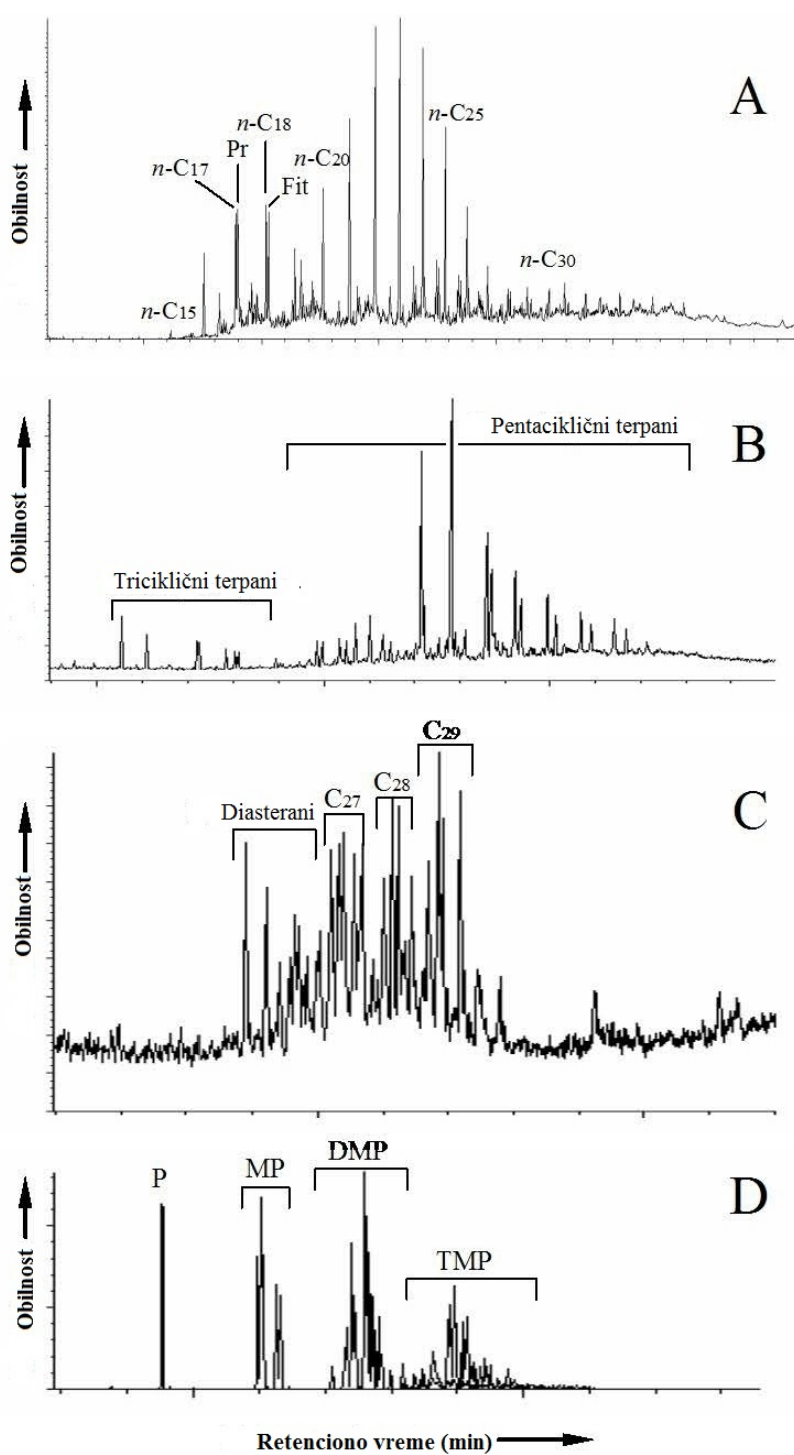
Frakcije zasićenih ugljovodonika i aromata su analizirane gasnohromatografskom-masenospektrometrijskom (GC-MS) tehnikom. Analize su rađene na gasnom hromatogramu Agilent 7890N sa HP5-MS kapilarnom kolonom (30 x 0,25mm, 0,25 µm film; temeperaturni opseg: 80 °C za 0 minuta, onda 2 °C min⁻¹ do 300 °C i onda održavano 20 minuta) u kojoj je helijum korišćen kao noseći gas (protok 1 cm³ min⁻¹). Gasni hromatograf je bio spojen sa Hewlett-Packard 5972 MSD koji je upravljao na 70eV u opsegu skeniranja 45-550. Detaljne analize željenih jedinjenja su izvedene u režimu pojedinačnog monitoring jona (SIM) uključujući sledeće jonske hromatograme: m/z 71 (*n*-alani i izoprenoidi), m/z 217 (sterani), m/z 191 (terpani), m/z 178 (fenantren), m/z 192 (metil-fenantreni), m/z 206 (dimetil-fenantreni) i m/z 220 (trimetil-fenantreni).

4.4.4. Pregled dobijenih rezultata

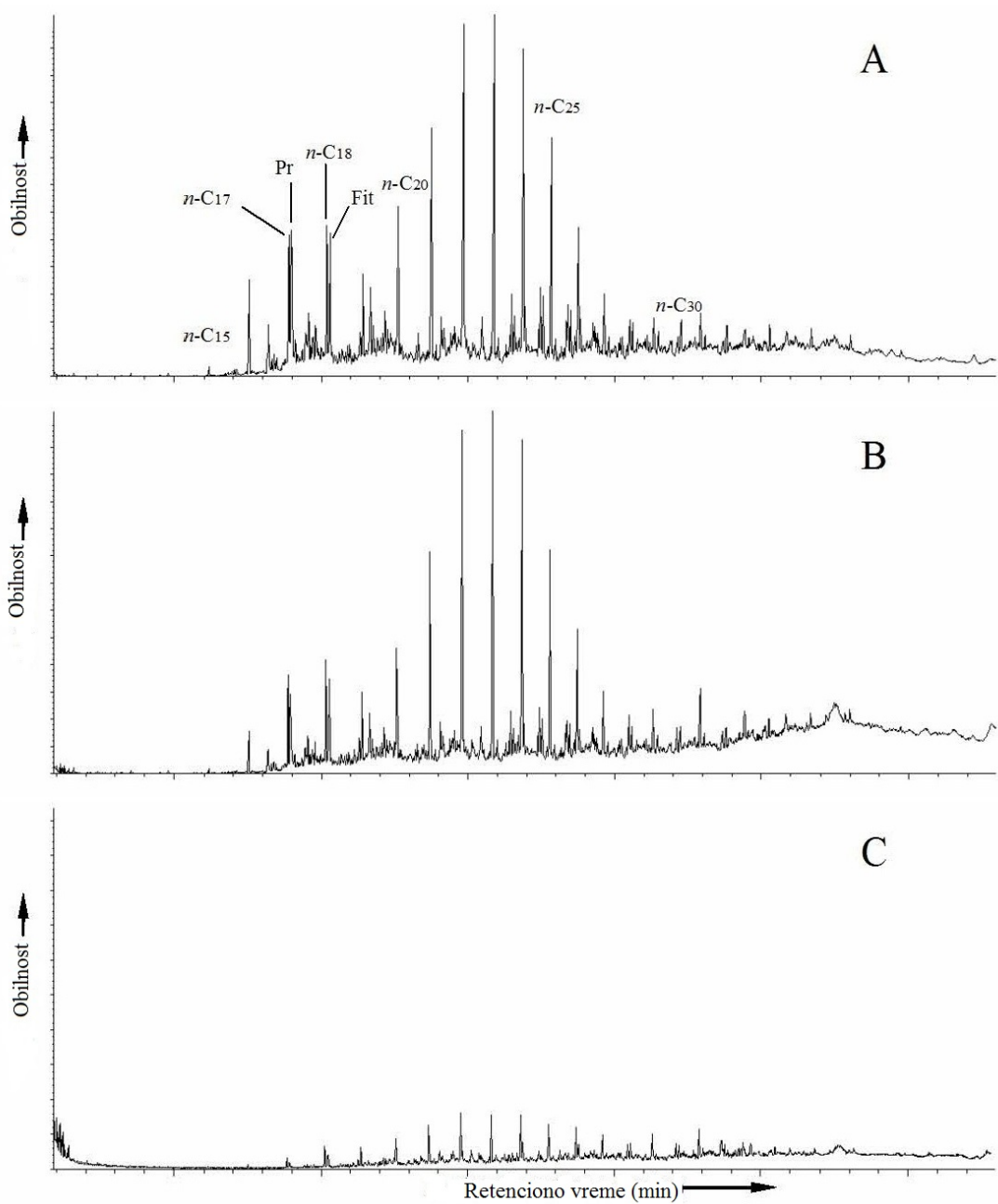
Maseni fragmentogrami *n*-alkana kao i izoprenoidnih alifatičnih alkana pristana i fitana, terpana, sterana, fenatrena, metil-fenatrena, dimetil-fenantrena i trimetil-fenantrena na početku eksperimenta su prikazani na slici 22.

Zasićeni ugljovodonici – Maseni fragmentogrami *n*-alkana i izoprenoidnih alifatičnih alkana pristana i fitana u ispitivanim uzorcima prikazani su na slici 23. Maseni fragmentogrami terpana su prikazani na slici 24, dok su maseni fragmentogrami sterana su prikazani na slici 25.

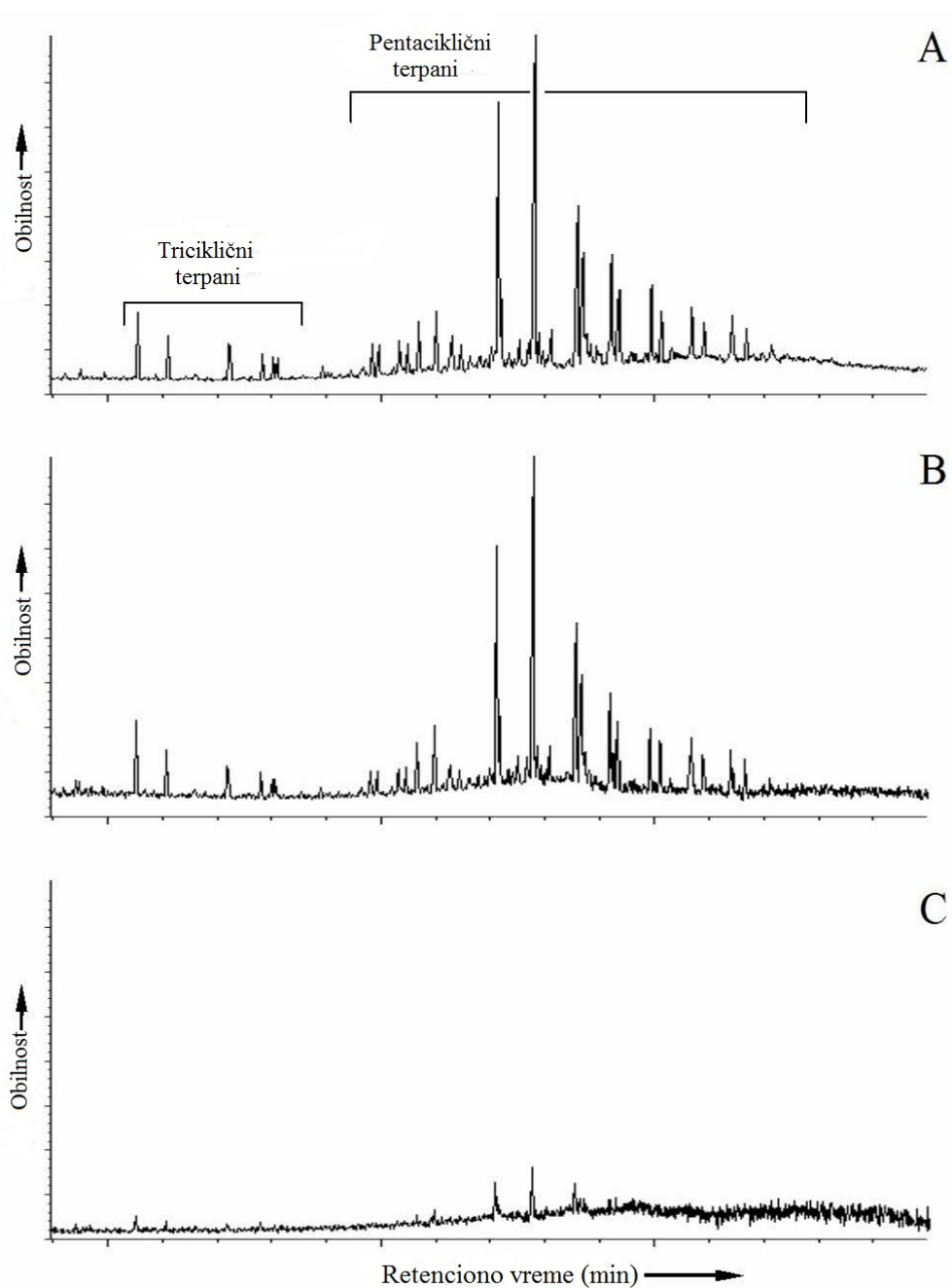
Aromatični ugljovodonici – Maseni fragmentogrami fenantrena, metil-fenantrena, dimetil-fenantrena i trimetil-fenantrena dobijenih gasnohromatografskom-masenospekopskim analizama aromatične frakcije su prikazani na slici 26.



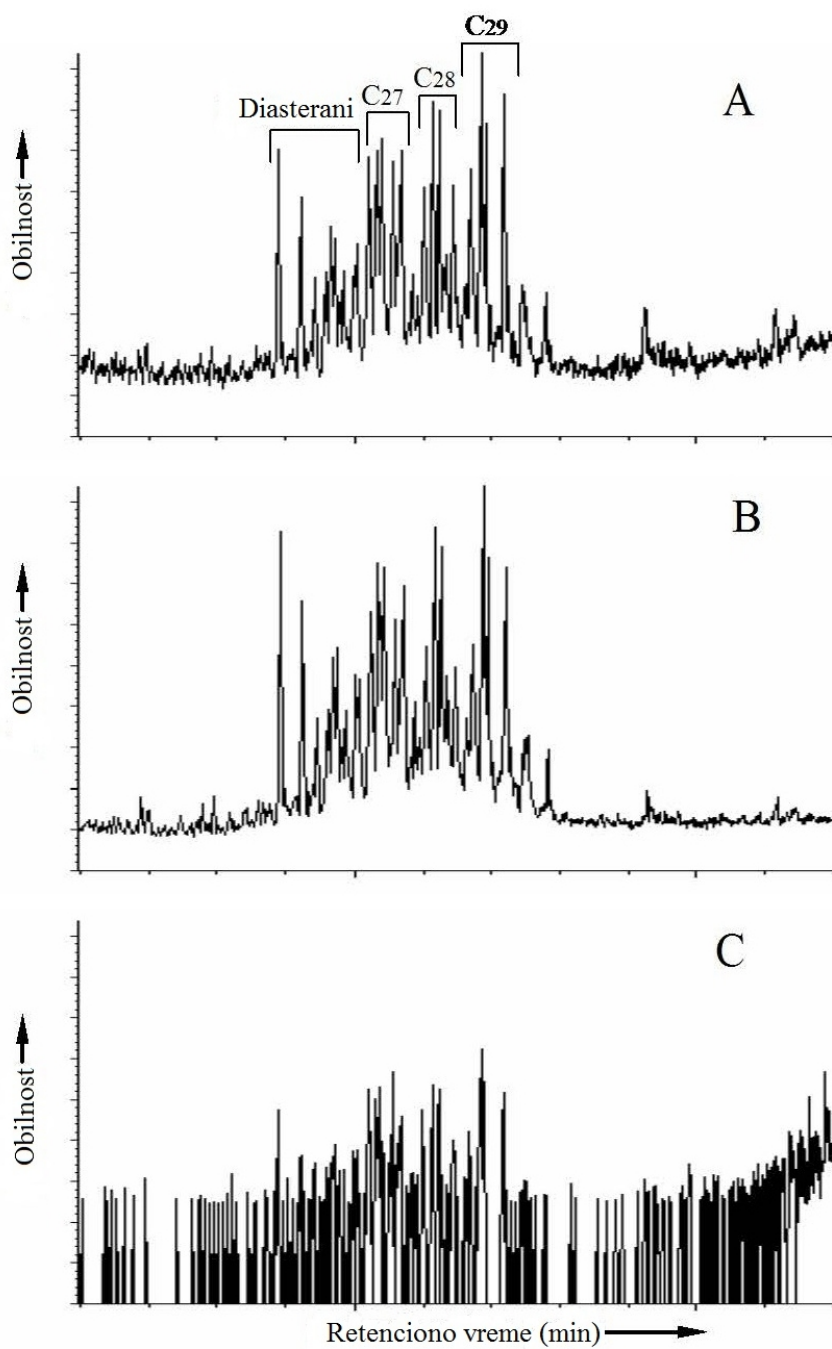
Slika 22. Raspodele i obilnosti *n*-alkana i izoprenoidnih alifaticnih alkana pristana i firtana, terpana, sterana i fenantrena (i njegovih metil-, dimetil- i trimetil-izomera) na početku ekperimenta.



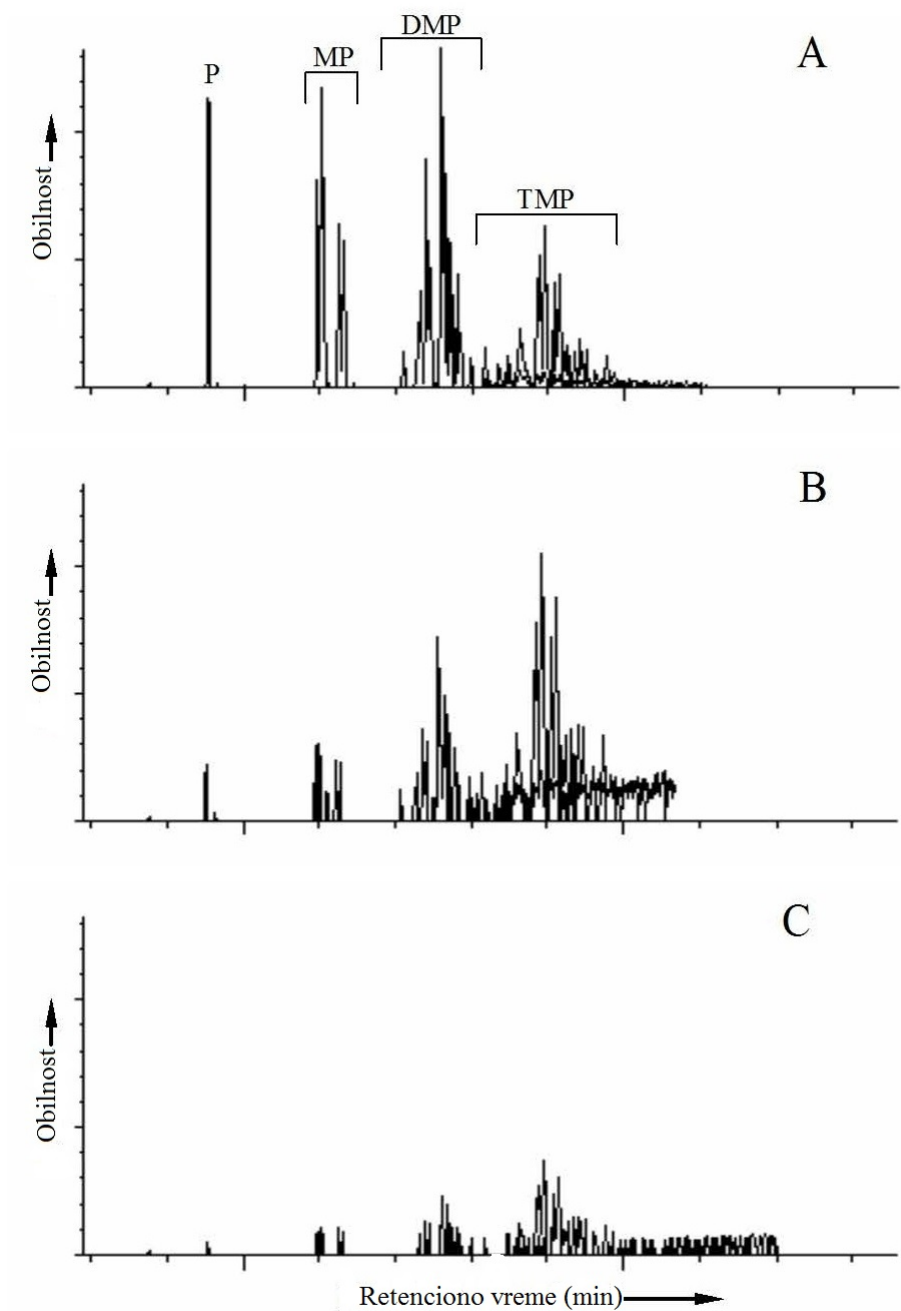
Slika 23. *n*-Alkani i izoprenoidni alifatični alkani pristan (Pr) i fitan (Phyt): na početku eksperimenta (a), posle 30 dana (b) i na kraju eksperimenta, posle 60 dana (c).



Slika 24. Promene u raspodeli i obilnosti tricikličnih diterpana i pentacikličnih triterpana u alkanskim frakcijama naftnog polutanta tokom 60 dana eksperimenta višestepene bioremedijacija u *in situ* uslovima.



Slika 25. Promene u raspodeli i obilnosti diasterana i C₂₇-C₂₉ sterana u alkanskim frakcijama naftnog polutanta tokom 60 dana eksperimenta višestepene bioremedijacija u *in situ* uslovima.



Slika 26. Promene u raspodeli i obilnosti fenatrena i njegovih metil-, dimetil- i trimetil-izomera u aromatičnim frakcijama naftnog polutanta tokom 60 dana eksperimenta višestepene bioremedijacija u *in situ* uslovima.

5. DISKUSIJA O REZULTATIMA

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivan uticaj bioremedijacionih uslova na biodegradaciju zasićenih i aromatičnih ugljovodonika u zagađujućim supstancama naftnog tipa. Primijenjena su četiri različita pristupa: ogled simulirane biodegradacije u laboratoriji, ogled *ex situ* bioremedijacije kontaminiranog zemljišta iz rafinerije Pančevo, ogled *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom i ogled višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim zagađivačem.

I

U prvom ogledu je određivan bioremedijacioni potencijal aerobnih zimogenih mikroorganizma u biodegradaciji sirove nafte. Mikroorganizmi koji su korišćeni u eksperimentu su izolovani iz uzoraka zemljišta uzetog u blizini otpadnog kanala u koji se izlivaju otpadne vode iz naftne rafinerije i azotare Pančevo. Kod izolovanih mikroorganizama su bile najzastupljenije bakterije iz roda *Bacillus* i *Aktinomicete*, dok je od gljiva najzastupljeniji bio rod *Penicillium*. Smeše parafinskih nafte su korišćene kao supstrat za zimogene mikroorganizme. Laboratorijski eksperiment simulirane biodegradacije je trajao 15, 30, 45, 60 i 75 dana. Paralelno je rađen i eksperiment sa kontrolnim uzorkom. Ekstrakti su izolovani iz uzorka hloroformom u levku za odvajanje. Iz ovih uzoraka ugljovodonici su frakcionisani hromatografijom na koloni i analizirani gasnohromatografski-masenospektrometrijski (GC-MS). *n*-Alkani, izoprenoidi, fenatren, metal-fenantreni i dimetil-fenantreni su kvantitativno analizirani.

Ukupni jonski hromatogrami (TIC) frakcije zasićenih ugljovodonika su prikazani na slici 16. Dominantna jedinjenja u frakciji zasićenih ugljovodonika su bili *n*-alkani i izoprenoidi pristan i fitan. Na kraju eksperimenta u ukupnom jonskom hromatogramu dominirali su sterani kao najzastupljenija jedinjenja zasićene ugljovodonične frakcije.

Jonski fragmentogrami *n*-alkana i izoprenoida iz frakcije zasićenih ugljovodonika (m/z 57) su prikazani na slici 17. Jonski fragmentogram *n*-alkana i izoprenoida kontrolnog uzorka karakterišu *n*-alkani u opsegu C_{13} - C_{41} sa uniformnom raspodelom parnih i neparnih homologa. Poređenjem jonskih fragmentograma ugljovodonične frakcije uzorka nakon 14 dana trajanja biodegradacije i kontrolnog uzorka može se zaključiti da su biodegradacijom najviše bili izoženi *n*-alkani niži od C_{30} . Više vrednosti odnosa $Pr/n-C_{17}$ kao i $Phyt/n-C_{18}$ u odnosu na iste parametre u kontrolnom uzorku ukazuju na višu izloženost biodegradaciji *n*-

alkana u odnosu na izoprenoide. Na osnovu rezultata nakon 15 dana biodegradacije (Tabela 4) došlo je do smanjenja *n*-alkana od 38,94%, a smanjenju su najviše bili izloženi *n*-alkani u C₁₃-C₃₀ opsegu. Nakon 30 dana eksperimenta došlo je do gubitka *n*-alkana od 61,23% u odnosu na kontrolni uzorak (Tabela 4) uz dodatno povećavanje odnosa Pr/*n*-C₁₇ kao i Phyt/*n*-C₁₈ što ukazuje na sporiju degradaciju izoprenoida, čak i kada je više od 60% *n*-alkana degradovano. Nakon 45 dana eksperimenta *n* alkani niži od C₁₆ su bili kompletno degradovani. Koncentracija preostalih *n*-alkana je bila niža za 84,11% u odnosu na kontrolni uzorak. Pad u vrednostima odnosa Pr/*n*-C₁₇ kao i Phyt/*n*-C₁₈ u odnosu na prethodne uzorke ukazuje na značajnu degradaciju izoprenoida. Na osnovu ovog podatka može se zaključiti da je do značajnije degradacije izoprenoida došlo tek nakon uklanjanja više od 80% *n*-alkana. Nakon 60 dana eksperimenta došlo je do uklanjanja više od 98,37% *n*-alkana i identifikovani su *n*-alkani u opsegu C₂₆-C₄₁ od kojih većinu nije bilo moguće kvantifikovati. Konačno, na kraju eksperimenta došlo je do potpune degradacije *n*-alkana i izoprenoida.

Jonski fragmentogrami sterana (m/z 217) i terpana (m/z 191) su prikazani na slici 18. Poređenjem jonskih hromatograma sterana i terpana može se zaključiti da tokom biodegradacionog eksperimenta nije došlo do promene u zastupljenosti i raspodeli triterpana i sterana. Stoga, može se zaključiti da tokom eksperimenta nije došlo do razgradnje sterana i terpana i da je biodegradacija zasićenih ugljovodonika isključivo ograničena na razgradnju acikličnih alifatičnih jedinjenja (*n*-alkana i izoprenoida).

Jonski fragmentogrami fenantrena (m/z 178), metil-fenantrena (m/z 192) i dimetil-fenantrena (m/z 206) su prikazani na slici 19. Tokom trajanja biodegradacionog eksperimenta najizraženije promene u koncentraciji aromata su uočene kod fenantrena. Samo nakon 15 dana eksperimenta došlo je do degradacije 61,90% fenantrena (tabela 5). Tokom nastavka eksperimenta pad u koncentraciji fenantrena je bio manje izražen. Na kraju eksperimenta 82,94% fenantrena je bilo degradovano. Kod metil-fenantrena nije uočeno tako drastično smanjenje kao kod fenantrena. Nakon 15 dana došlo je do degradacije 48,49% metil-fenantrena, a na kraju eksperimenta (75 dan) došlo je do degradacije 74,74% metil-fenantrena. Tokom eksperimenta nije uočena veća promena u koncentraciji dimetil-fenantrena. Nakon 75 dana došlo je do smanjenja dimetil-fenantrena od samo 2,34%. Nakon prezentovanih rezultata može se zaključiti zimogeni mikroorganizmi iz zemljišta imaju značajno visok potencijal u degradaciji fenantrena i metil-fenantrena, ali se mora naglasiti da biodegradacija ovih jedinjenja na kraju eksperimenta nije bila kompletna.

II

Kao što je već istaknuto, izvođeni su i eksperimenti *ex situ* bioremedijacije zemljišta na lokalitetu rafinerije nafte Pančevo. Kontaminirano zemljište koje je prikupljeno sa različitih lokacija rafinerije nafte Pančevo je bilo pomešano sa piljevinom, estrima dugolančanih alkohola i masnih kiselina i prirodnim đubrivom je uređeno u homogenizovanu gomilu i izvršena je instalacija cevi za aeraciju i sistema za prikupljanje procedne tečnosti. Prirodno đubrivo je korišćeno za stimulaciju mikroorganizma kao izvor azota i fosfora. Mikroorganizmi koji su izolovani iz zemljišta koje je kontaminirano naftom i za koje se smatra da mogu da efikasno degraduju ugljovodonike su umnoženi u laboratorijskom bioreaktoru i kao aktivna biomasa su aplikovani na haldu jednom nedeljno. Ekperimenti *ex situ* bioremedijacije su izvođeni u periodu od šest meseci i u toku eksperimenta je prikupljeno ukupno 12 uzoraka (uzorci P₁-P₁₂). Organska supstanca iz uzoraka je izolovana ekstrakcijom po Soksletu. Dobijeni ekstrakti su frakcionisani hromatografijom na koloni u frakcije zasićenih ugljovodonika, aromata, alkohola i masnih kiselina. Pojedina jedinjenja iz dobijenih frakcija su analizirana gasnohromatografski-masenospektrometrijski (GC-MS).

Količina ekstrahovane supstance iz uzoraka P₁-P₁₂, kao i količina frakcija dobijena hromatografskim razdvajanjem su prikazani u tabeli 6. Količina ekstrahovane organske supstance iz uzoraka P₁-P₁₂ je varirala od 4,1 do 6,6%. Iako je u poslednjem uzorku izolovana najmanja količina organske supstance, ne može se sa sigurnošću zaključiti da je uočeno konstantano smanjenje organske supstance u toku vremena. Jedini regularni pad je uočen u frakciji zasićenih ugljovodonika. Tokom vremena u ovoj frakciji došlo je do značajnog smanjenja u uzorcima P₈ do P₁₂ (smanjenja od 58,1% u uzorku P₈ do 33,3% u uzorku P₁₂). S obzirom na rezultate iz tabele 6, može se zaključiti da je do mikrobiološke degradacije došlo u drugom delu bioremedijacionog eksperimenta. Budući da su zasićeni ugljovodonici najmanje otporni na biodegradaciju u odnosu na ostale frakcije nafte, dobijeni rezultati su očekivani i logični.

Bolji uvid u prezentovane rezultate se dobija prikazivanjem ostatatka koji je ostao na koloni prilikom hromatografskog odvajanja. Rezultati hromatografskog razdvajanja koji uključuju i frakciju preostalu na koloni su prikazani u tabeli 7. Na osnovu rezultatata iz tabele 7, može se zaključiti da u uzorcima P₈-P₁₂ nije došlo do značajnog smanjenja u frakciji zasićenih ugljovodonika, a da je došlo do povećanja količina frakcija masnih kiselina od 5,9% do 16,7%. GC-MS analiza je potvrdila da su masne kiseline dominiraju u ovoj frakciji. Uz određena odstupanja je uočen je i porast frakcija aromata i alkohola. U poslednoj fazi

bioremedijacionog ogleda (uzorci P₈-P₁₂) najočigledniji rezultat predstavlja smanjenje količine ostatka na kolni (od 39,2 do 2,8%) i povećanje ukupne količine eluata (od 60,08 do 97,2%). Na osnovu predstavljenih rezultata može se zaključiti da je aktivnost mikroorganizma vodila ka smanjenju nerastvornog dela naftnog zagađivača. Rezultati grupnog sastava ekstrakata pokazuju u svim uzorcima porast svih polarnih frakcija (aromata, alkohola i masnih kiselina) i približno konstantnu količinu zasićenih ugljovodonika. Smanjenje količine frakcije zasićenih ugljovodonika predstavljeno u tabeli 6. (računato samo u odnosu na masu eluata) je očigledno i posledica povećanja količine ostalih frakcija. Na osnovu svih prezentovanih rezultata može se sumirati da su značajne promene u sastavu naftnog zagađivača uočene samo u poslednjoj fazi ekesperimenta (uzorci P₈-P₁₂). Aktivnost mikroorganizama ogledala se u povećanju količine polarnih naftnih frakcija, pre svega masnih kiselina, čime je povećana ukupna količina eluata, a količina nerastvornog ostatka na hromatografskoj koloni je svedena na minimum. Na taj način naftni zagađivač je doveden u oblik koji se može efikasnije ukloniti iz zemljišta.

III

U trećoj studiji su izvođeni eksperimenti *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom, i ispitivane su promene u raspodeli fenantrena i njegovih metil izomera, metil-fenantrena, dimetil-fenantrena i trimetil-fenantrena. Ekperimenti su izvođeni u periodu od šest meseci, od septembra 2009. do marta 2010. godine. Kontaminirano zemljište koje bilo oko godinu dana zagađivano mazutom je iskopano iz blizine elektrane i raspodeljeno preko neispranog peska. Odmah nakon mešanja sa peskom oko 10 m³ pomešanog materijala je izdvojeno u kontrolnu gomilu. Nakon toga je zemljište pomešano sa piljevinom, homogenizovano i uređeno u haldu. Na haldu je dodat biosurfaktant Bioslove tipa. Na haldu je kontinuirano dodavana biomasa i hranljive supstance. Biomasi su sačinjavali mikroorganizmi izolovani iz zemljišta zagađenog mazutom, koji su naknadno laboratorijski umnoženi. Biomasi su sačinjavali sledeće kulture mikroorganizama: *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas luteola*, *Achromobacter denitrificans*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Aeromonas hydrophilia*. Biomasa i hranljive supstance su dodavane jednom mesečno prevrtanjem i mešanjem halde. Hranljive supstance koje su se koristile za biostimulaciju mikroorganizma kao izvor azota, fosfora i kalijuma su činili rastvori neorganskih soli. Aeracija i mešanje halde je vršena dva put nedeljno putem mehanizacije. U

toku 6 meseci je uzeto po pet uzorka iz tretiranog i netretiranog zemljišta (uzorci obeleženi sa M1k-M5k). Kontrolni uzorci su uzeti iz netretiranog zemljišta, kontaminiranog zemljišta kojem nije dodavana piljevina, biomasa, nutrienti i surfaktanti. Kontaminant iz zemljišta iz koga su uzeti kontrolni uzorci je bio samo izložen transformacijama koje se javljaju prilikom prirodne mikrobiološke razgradnje naftnog zagađivača. Predmet ove doktorske disertacije su rezultati dobijeni analizom kontrolnih uzoraka M1k-M5k. Organska supstanca je izolovana iz uzorka ekstrakcijom po Soksletu. Dobijeni ekstrakti su frakcionisani hromatografijom na koloni u frakcije zasićenih ugljovodonika, aromata, alkohola i masnih kiselina. Aromatična frakcija je analizirana gasnohromatografski-masenospektrometrijski (GC-MS).

Maseni fragmentogrami fenantrena (m/z 178), metil-fenantrena (m/z 192), dimetil-fenantrena (m/z 206) i trimetil-fenantrena (m/z 220) uzoraka M1k-M5k su prikazani na slici 20. Odnosi fenantrena i najintenzivnijih metil-fenantrena, dimetil-fenantrena i trimetil-fenantrena, kao i odnosi metil-fenantrena i trimetil-fenantrena su prikazani na slici 21. Na osnovu fragmentograma sa slike 20, kao i parametra prikazanih na slici 21, može se uočiti da je u uzorcima M1k-M5k došlo do smanjenja koncentracije fenantrena u odnosu na metil-fenantrene, dimetil-fenantrene i trimetil-fenantrene. To smanjenje je najizraženije za trimetil izomere ($P/TMP = 0,85-0,11$) a najmanje je izraženo za metil izomere ($P/MP = 0,91-0,61$). Odnos između metil-fenantrena i trimetil-fenantrena se ravnomerno smanjivao od 0,93 do 0,17. Na osnovu prezentovanih rezultata može se zaključiti da su biodegradacioni procesi kod uzorka M1k-M5k rezultovali u smanjenju koncentracije fenantrena, kao i metil-fenantrena u odnosu na dimetil-fenantrena i trimetil-fenantrene. Navedeni rezultati se mogu smatrati uobičajenim i tipičnim, s obzirom na to da je uveliko poznato da mikroorganizmi lakše metabolišu nesupstituisane policiklične aromatične ugljovodonike u odnosu na supstituisane policiklične aromatične ugljovodonike, i da stepen degradacije opada sa povećanjem broja suspsituenta na policikličnim aromatičnim ugljovodonicima. Takođe preferencijalnoj degrafaciji fenatrena u odnosu na metil sustituisane fenatrene doprinosi i njegova veća biodostupnost, budući da je fenatren oko četiri puta rastvorljiviji od metil-fentrena, a oko 16 puta rastvorljiviji od odgovarajućih dimetil-fentrena. Povećanje broja metil grupa na fenatrenskom jezgru doprinosu manjoj rastvorljivosti, odnosno manjoj biodostupnosti navedenih jedinjenja mikroorganizmima.

IV

U četvrtoj studiji su izvođeni ogledi višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim zagađivačem. Ekperimenti su izvođeni u periodu od dva meseca, od maja do jula 2012. godine. Površinske vode koje su nekoliko godina bile zagađivane naftnim derivatima koji su curili iz skladišta su bile prečišćene višestepenom *in situ* bioremedijacijom u zatvorenom sistemu. Ova nova inventivna tehnika nastala kao kombinacija filtraciono adsorpcione remedijacione tehnike kao i *in situ* bioremedijacije je prvi put primenjena u ovom ogledu. Naftni zagađivač koji je uklonjen iz površinskih voda pomoću prirodnih neorganskih hidrofobnih adsorbensa je zatim degradovan *in situ* bioremedijacijom u posebnom bioreaktoru. Prirodni biodegradacioni procesi u bioreaktoru su ubrzani aeracijom, biostimulacom dodatkom rasrvora hranljivih materija, kao i bioaugmentacijom – dodatkom biomase koju su sačinjavali mikroorganizmi izolovani u kontaminiranim površinskim vodama. U toku izvođenja ogleda uzorci su uzimani tri puta. Organska supstanca koja je izolovana ekstrakcijom je zatim frakcionisana hromatografijom na koloni u tri različite frakcije, frakciju zasićenih ugljovodonika, frakciju aromata i frakciju NSO jedinjenja. Prve dve frakcije su analizirane gasnohromatografski-masenospektrometrijski (GC-MS).

Maseni fragmentogrami *n*-alkana i izoprenoida (m/z 71), terpana (m/z 191), sterana (m/z 217), kao i fenatrena sa svojim metil-, dimetil- i trimetil-izomerima (m/z 178, 192, 206 i 220) na početku eksperimenta su prikazani na slici 22. *n*-Alkane u alkanskoj frakciji polutanta karakteriše bimodalna raspodela sa maksimumima na C_{18} i C_{23} . Ovakva raspodela ukazuje da značajnije biodegradacije polutanta u prirodnim uslovima pre početka eksperimenta nije bilo. Na isti zaključak navode i raspodele karakteristične za nafte terpana i sterana iz alkanskih frakcija, kao i fenentrena sa svojim izomerima su na početku eksperimenta. Promene u obilnosti i raspodeli *n*-alkana i izoprenoidnih alifatičnih alkana pristana i fitana na početku eksperimenta i nakon 30 i 60 dana su prikazane na slici 23. Na osnovu iste, može se zaključiti da se u toku prvih 30 dana *n*-alkani i izoprenoidi nisu značajnije promenili, dok je nakon 60 dana došlo do njihove potpune razgradnje. Promene u obilnosti i raspodeli tricikličnih diterpana i pentacikličnih triterpana u alkanskim frakcijama naftnog polutanta na početku eksperimenta i nakon 30 i 60 dana su prikazane na slici 24. Na osnovu skoro identičnih fragmentograma na početku eksperimenta i nakon 30 dana može se zaključiti da u prvih 30 dana nije uopšte došlo do degradacije tricikličnih diterpana i pentacikličnih triterpana. Sasvim suprotno tome, nakon 60 dana je došlo do skoro potpune razgradnje ovih policikličnih alkana. Identičan trend razgradnje je uočen i kod sterana (slika

25). Razgradnja fenatrena i njegovih metil-, dimetil- i trimetil-izomera (slika 26), tekla je u izvesnoj meri drugačije u odnosu na razgradnju *n*-alkana i izoprenoida, sterana i terpana. Tu je već nakon 30 dana uočeno njihovo znatno smanjenje u odnosu na početak eksperimenta. Na kraju eksperimenta svi ovi aromatični ugljovodonici su bili razgrađeni. Rezultati ove studije predstavljaju veliki uspeh, sa potpuno razorenim jedinjenjima koja su se u prethodne tri studije pokazala kao najotpornija na dejstvo mikroorganizama.

6. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji izloženi su eksperimenti *ex situ* bioremedijacije zagađenog zemljišta u rafineriji nafte Pančevo (od maja do novembra 2006 godine), eksperimenti simulirane biodegradacije u laboratorij, *ex situ* bioremedijacija zemljišta zagađenog mazutom (od septembra 2009. do marta 2010. godine) i i ogled višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim derivatima od maja do jula 2012. godine.

U prve tri studije je korišćen identičan analitički postupak za karakterizaciju supstrata. Nakon uzimanja uzoraka, organska supstanca je ekstrahovana metodom po Soksletu, a zatim razložena hromatografijom na koloni u četiri različite frakcije: frakciju zasićenih ugljovodonika, frakciju aromata, frakciju alkohola i frakciju masnih kiselina. U četvrtoj studiji je organska supstanca, nakon ekstrakcije razložena hromatografijom na koloni u tri frakcije: frakciju zasićenih ugljovodonika, frakciju aromata i frakciju NSO jedinjenja. Pojedine frakcije su zatim analizirane gasnom hromatografijom-masenom spektroskopijom (GC-MS). Zaključci dobijeni interpretacijom eksperimentalnih rezultata u sve četiri studije doprinose pojašnjenju uticaja bioremedijacionih uslova na biodegradaciju zasićenih i aromatičnih ugljovodonika u zagađujućim supstanca naftnog tipa, kao i usavršavanju i razvoju bioremedijacionih tehnika.

Ogled *ex situ* bioremedijacije koji je izvođen u rafineriji nafte Pančevo od maja do novembra 2006. godine se fokusirao prvenstveno na količinu dobijenih frakcija tokom bioremedijacionog ogleada, a dobijene frakcije nisu dodatno analizirane instrumentalnim tehnikama. Najvažniji zaključak koji proizilazi iz navedene studije je da tokom analize količine frakcija dobijenih hromatografijom na koloni neophodno je ukalkulisati i količinu ostatka koji ostaje na koloni. Od početka do kraja bioremedijacionog ogleada količina ostatka na koloni je smanjena sa 20% na 2,8%, što govori da je aktivnost mikroorganizama znatno doprinela smanjnu nerastvorne frakcije. Takođe, tokom bioremedijacionog ogleada je došlo do povećanja količine polarnih frakcija, na prvom mestu frakcija masnih kiselina, čime je naftni zagađivač doveden u oblik koji se može efikasnije ukloniti iz životne sredine.

Ogled simulirane biodegradacije u laboratoriji je izvođen radi procene bioremedijacionog potencijala aerobnih zimogenih mikroorganizma iz zemljišta pri biodegradaciji nafte. Zimogeni mikroorganizmi su izolovani iz zemljišta u blizini kanala

otpadnih voda pored naftne rafinerije Pančevo, smatrajući da su se dobro prilagodili degradaciji nafte. Nakon 75 dana ogleda simulirane biodegradacije u laboratorijskim uslovima ustanovljen je najveći stepen degradacije alkana i izoprenoida, znatan stepen degradacije fenatrena i nešto manji stepen degradacije metil-fenatrena u odnosu na fenantren, neznatni stepen degradacija dimetil-fenatrena, dok je ustanovljeno da policiklični alkani sterani i terpani gotovo uopšte nisu bili degradovani. Na osnovu navedenih rezultata ustanovljeno je da zimogeni mikroorganizmi imaju najveći bioremedijacioni potencijal za degradaciju alkana i izoprenoida i visok bioremedijacioni potencijal za degradaciju fenatrena i metil-fenatrena.

Ogled *ex situ* bioremedijacije zemljišta zagađenog mazutom je izvođen od septembra 2009 do marta 2010 godine. Nakon mešanja zemljišta kontaminiranog mazutom sa peskom, deo smeše je izdvojen i izložen je samo uobičajenim biodegradacionim procesima od strane mikroorganizma koji su već bili prisutni u zemljištu zagađenim sa mazutom. U ovoj studiji je ispitivana isključivo aromatična frakcija, odnosno promene u stepenu degradacije fenantrena, metil-fenantrena, dimetil-fenantrena i trimetil-fenantrena. Tokom biodegradacionog ogleda došlo je do najintenzivnije degradacije fenatrena, nižeg stepena degradacije metil-fenatrena, još nižeg stepena degradacije dimetil-fenantrena i najnižeg stepena degradacije trimetil-fenantrena. Analizom dobijenih rezultata ustanovljeno je da se stepen degradacije smanjuje sa povećanjem broja metil grupa na fenantrenskom jezgru, odnosno uočena je preferencijalna degradacija fenantrena u odnosu na metil supstituisane fenatrene. Dobijeni rezultati su logični i očekivani. Naime, poznato je da enzimi mikroorganizama teže razlažu višesupstituisane policiklične aromatične ugljovodonike sa većim brojem supstituenata. Takođe većem stepenu degradacije fenatrena u odnosu na metil supstituisane fenatrene doprinosi i veća rastvorljivost, odnosno biodostupnost fenatrena u odnosu na metil supstituisane fenatrene, s obzirom da svaka dodatna metil grupa na fenantrenskom jezgru doprinosi znatnom smanjenju rastvorljivosti. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su kompatibilni sa rezultatima dobijenim iz ogledima simulirane bioremedijacije u laboratoriji, gde je takođe uočena preferencijalna degradacija fenatrena u odnosu na metil-fenatrene i dimetil-fenatrene, kao i metil-fenatrena u odnosu na dimetil-fenatrene.

Ogled višestepene *in situ* bioremedijacije izdani kontaminirane naftnim zagađivačem je izvođen od maja do jula 2012 godine. Naftni zagađivač je nakon izdvajanja iz površinskih voda pomoću prirodnih hidrofobnih neorganskih adsorbenasa u posebnoj eksternoj jedinici prosleđen u zatvorenom sistemu do bioreaktora gde je degradovan *in situ* bioremedijacijom.

Tokom trajanja oglada prirodni degradacioni postupci su ubrzani aeracijom, biostimulacijom i bioaugmentacijom pomoću mikroorganizama koji su izolovani u kontaminiranim površinskim vodama. Nakon 60 dana eksperimenata uočena je kompletna degradacija svih ispitivanih jedinjenja, *n*-alakana i izoprenoida, sterana, terpana, fenantrena, metil-fenantrena, dimetil-fenatrena i trimetil-fenatrena. Ovi rezultati predstavljaju veliki uspeh, s obzirom na to da su u ovom ogledu potpuno degradovana jedinjenja koja su se pokazala kao teško biodegradabilna u prethodnim studijama. Odlični rezultati ove studije u odnosu na rezultate prethodnih studija su posledica nekoliko različitih faktora. Kao prvo, u ovoj studiji je izvođena bioremedijacija površinskih voda a ne kontaminiranog zemljišta, čime je eliminisana mogućnost adsorpcije naftnog zagađivača na česticama zemljišta. Drugi bitan faktor je da se biodegradacija izolovanog naftnog zagađivača izvodila u bioreктору. S obzirom da je opšte poznato da je obim biodegradacije naftnog zagađivača znatno veći kod biorekatora nego kod drugih bioremedijacionih tehnologija usled najbolje kontrole bioremedijacionih uslova, u ovoj studiji su i dobijeni znatno bolji rezultati u odnosu na prethodne studije.

7. LITERATURA

1. Walters, C.C., 2006. The origin of petroleum. In: Hsu, C.S., Robinson, P.R. (Ed.), *Practical Advances in Petroleum Processing*, Springer, 79-101.
2. Wellings, F.E., 1966. Geological aspects the origin of oil. *Journal of the Japan Petroleum Institute* **52**, 124-130.
3. Engler, K.O.V., 1913. *Die Chemie und Physik des Erdöls*, S. Hirzel, Leipzig
4. Treibs, A., 1936. Chlorophyll and hemin derivatives in organic mineral substances. *Angewandte Chemie* **49**, 682-686.
5. Oakwood, T.S., Shriver, D.S., Fall, H.H., McAleer, W.J., Wunz, P.R., 1952. Optical activity of petroleum. *Industrial and Engineering Chemistry* **44**, 2568-2570.
6. Eglinton, G., Calvin, M., 1967. Chemical fossils. *Scientific American* **216**, 32-43.
7. Abelson, P.H., 1963. *Organic geochemistry and the formation of petroleum*. Sixth World Petroleum Congress Proceedings, Section 1, 397-407.
8. Philippi, G.T., 1965. On the depth, time and mechanism of petroleum generation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **29 (9)**, 1021-1049.
9. Tissot, B.P., Welte, D.H., 1978. *Petroleum Formation and Occurrence. A New Approach to Oil and Gas Exploration*, Springer, Berlin
10. Tissot, B.P., Welte, D.H., 1984. *Petroleum Formation and Occurrence, Second Revised and Enlarged Version*, Springer, Berlin
11. Berthelot, M.P., 1860. *Chimie organique fondée sur la synthèse*
12. Mendeleev, D., 1877. L'origine du petrole. *Revue Scientifique* **2e Ser., VIII**, 409-416.
13. Höök, M., Bardi, U., Feng, L., Pang, X., 2010. Development of oil formation theories and their importance for peak oil. *Marine and Petroleum Geology* **27**, 1995-2004.
14. Sherwood Lollar B., Westgate, T.D., Ward, J.A., Slater, G.F., Lacrampe-Couloume, G., 2002. Abiogenic formation of alkanes in the Earth's crust as a minor source for global hydrocarbon reservoirs. *Nature*, **416**, 522-524.
15. Vitorović, D., Jovančičević, B., 2005. *Osnovi organske geohemije za studente hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu*, Hemijski fakultet, Beograd
16. Jovančičević, B., 1999. *Praktikum organske geohemije sa hemijom goriva*, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd

17. EPA, 1996. Behaviour of Hydrocarbons in the Subsurface. In *How to Effectively Recover Free Product At Leaking Underground Storage Tank Sites: A Guide for State Regulators*, U.S. Environmental Protection Agency
18. Urošević, S., Mikijelj, V., 1979. *Tehnologija*, Univerzitet u Beogradu, Beograd
19. Moldowan J.M, Fago F.J., Lee C.Y., Jacobson S.R., Watt D.S., Slougui N.E., Jeganathan A., Young D.C., 1990. Sedimentary 24-*n*-propylcholestanes, molecular fossils diagnostic of marine algae. *Science*, **247**, 309-312.
20. Carlson, R.M.K., Teerman, S.C., Moldowan, J.M., Jacobson, S.R., Chan, E.I., Dorrough, K.S., Seetoo, W.C., Mertani, B., 1993. High temperature gas chromatography of high-wax oils: Indonesian Petroleum Association, *22nd Annual Convention Proceedings*. Jakarta, Indonesia, 483-507.
21. Hsieh, M., Philp, R.P., 2001. Ubiquitous occurrence of high molecular weight hydrocarbons in crude oils. *Organic Geochemistry* **32(8)**, 955-966.
22. Moldowan, J.M., Siefert, W.K., 1980. First discovery of botryococcane in petroleum, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication* **19**, 912-914.
23. Metzger, P., Largeau C., 1999. Chemicals of *Botryococcus braunii*. In *Chemicals from Microalgae*, Taylor & Francis, 205-260.
24. Hall, P.B., Douglas A.G., 1983. The distribution of cyclic alkanes in two lacustrine deposits. In: M. Bjorøy (Ed.), *Advances in Organic Geochemistry 1981*. J. Wiley and Sons New York, 576-587.
25. Zusheng, J., Fowler M.G., 1986. Carotenoid-derived alkanes in oils from northwestern China. In: Leythaeuser, D., and Rullkötter, J., (Eds.), *Advances in Organic Geochemistry 1985*. Organic Geochemistry, v. 10, Pergamon, 831-839.
26. Moldowan, J.M., Seifert, W.K., Gallegos, E.J., 1985. Relationship between petroleum composition and depositional environment of petroleum source rocks. *AAPG Bulletin* **69**, 1255-1268.
27. Zumberge, J.E., 1987. Prediction of source rock characteristics based on terpane biomarkers in crude oils: A multivariate statistical approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **51**, 1625-1637.
28. Holba, A.G., Tegelaar, E., Ellis, L., Singletary, M.S., Albrecht, P., 2000. Tetracyclic polyprenoids: Indicators of freshwater (lacustrine) algal input. *Geology* **28**, 251-254.
29. Ekweozor, C.M., Udo, O.T., 1988. The oleananes: Origin, maturation, and limits of occurrence in Southern Nigeria sedimentary basins. In: Mattavelli, L., and Novelli, L., (Eds.), *Advances in Organic Geochemistry 1987*. Organic Geochemistry, 13, Pergamon Press, 131-140.

30. Cox, H.C., De Leeuw, J.W., Schenck, P.A., Van Koningsveld, H., Jansen, J.C., Van De Graaf, B., Van Geerestein, V.J., Kanters, J.A., Kruk, C., Jans, A.W.H., 1986. Bicadinane, a C₃₀ pentacyclic isoprenoid hydrocarbon found in crude oil. *Nature* **319**, 316-318.
31. Noble, R.A., Alexander, R., Kagi, R.I., Knox, J., 1985. Tetracyclic diterpenoid hydrocarbons in some Australian coals, sediments and crude oils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **49**, 2141-2147.
32. Huang, W.Y., Meinschein W.G., 1979. Sterols as ecological indicators. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **43**, 739-745.
33. Moldowan, J.M., Seifert W.K., Gallegos E.J., 1985. Relationship between petroleum composition and depositional environment of petroleum source rocks. *AAPG Bulletin* **69**, 1255-1268.
34. Hughes, W.B., Holba, A.G., Dzou, L.I.P., 1995. The ratios of dibenzothiophene to phenanthrene and pristane to phytane as indicators of depositional environment and lithology of petroleum source rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**, 3581-3598.
35. Sinninghe Damste, J.S., Kenig, F., Koopmans, M.P., Koster, J., Schouten, S., Hayes, J.M, De Leeuw, J.W., 1995. Evidence for gammacerane as an indicator of water column stratification. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**, 1895-1900.
36. Ten Haven, H.L., De Leeuw, J.W., Rullkötter, J., Sinninghe Damste J.S., 1987. Restricted utility of the pristane/phytane ratio as a paleoenvironmental indicator. *Nature* **330**, 641-643.
37. Ten Haven, H.L., De Leeuw, J.W., Sinninghe Damste, J.S., Schenck, P.A, Palmer, S.E., Zumberge, J.E., 1988. Application of biological markers in the recognition of palaeo-hypersaline environments. In: Kelts, K., Fleet, A., and Talbot, M., (Eds.), *Lacustrine Petroleum Source Rocks*. Special Publication, 40, Blackwell, Geological Society, 123-130.
38. Peters, K.E., Moldowan J.M., 1991. Effects of source, thermal maturity and biodegradation on the distribution and isomerization of homohopanes in petroleum. *Organic Geochemistry* **17**, 47-61.
39. Summons, R.E., Powell, T.G., 1987. Identification of arylisoprenoids in a source rock and crude oils: Biological markers for the green sulfur bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **51**, 557-566.
40. Grice, K., Schouten, S., Peters, K.E., Sinninghe Damste, J.S., 1998. Molecular isotopic characterization of Palaeocene-Eocene evaporitic, lacustrine source rocks from the Jiangnan Basin, China. *Organic Geochemistry* **29**, 1745-1764.
41. Koopmans, M.P., Van Kaam-Peters, H.M.E., Schouten, S., De Leeuw, J.W., Sinninghe Damste, J.S, Koster, J., Kenig, F., Hartgers, W.A., 1996. Diagenetic and Catagenetic Products of Isorenieratene: Molecular Indicators For Photic Zone Anoxia, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **60**, 4467-4496.
42. Lewan, M.D., 1984. Factors controlling the proportionality of vanadium to nickel in crude oils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**, 2231-2238.

43. Pu, F., King, J.D., Claypool, G.E., 1988., Characteristics of biomarker compounds in Chinese crude oils. In: Kumar, R.K., Dwivedi, P., Banerjee, V., and Gupta, V., (Eds.), *Petroleum Geochemistry and Exploration in the Afro-Asian Region: proceedings of the first International Conference on Petroleum Geochemistry and Exploration in the Afro-Asian Region*. Dehradun, 25-27 November 1985, Rotterdam, Balkema, 197-202.
44. Subroto, E.A., Alexander, R., Kagi, R.I., 1991. 30-Norhopanes: their occurrence in sediments and crude oils. *Chemical Geology* **93**, 179-192.
45. Rubinstein, I., Sieskind, O., Albrecht, P., 1975. Rearranged steranes in a shale: Occurrence and simulated formation. *Journal of Chemical Society, Perkin Transaction I*, 1833-1836.
46. Hughes, W.B., 1984. Use of thiophenic organosulphur compounds in characterizing crude oils derived from carbonate versus siliciclastic sources. In: Palacas, J.G., (Ed.), *Petroleum Geochemistry and Source Rock Potential of Carbonate Rocks*. AAPG, Studies in Geology 18, 181-196.
47. Summons, R.E., Jahnke, L.L., Hope, J.M., Logan G.A., 1999. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* **400**, 554-557.
48. EIA, 2013. U.S. Energy Information Administration, URL <http://www.eia.gov/>
49. Ward, O., Singh, A., Van Hamme, J., 2003. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **30**, 260-270.
50. Rodgers R.P., Blumer E.N., Freitas M.A., Marshall A.G., 1999. Jet Fuel Chemical Composition, Weathering, and Identification as a Contaminant at a Remediation Site, Determined by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **71**, 5171-5176.
51. ATSDR, 1999. *Toxicological profile for total petroleum hydrocarbons (TPH)*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry Atlanta, GA, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service
52. EPA, 1996. The behavior and effects of oil spills in aquatic environments, In *Understanding Oil Spills and Oil Spill Response*, U.S. Environmental Protection Agency
53. Bossert I., Bartha R. 1984. The Fate of Petroleum in Soil Ecosystems, In: Atlas R.M., (Ed), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York, 435-476.
54. Dror I., Gerstl Z., Prost R., Yaron B., 2002. Abiotic behavior of entrapped petroleum products in the subsurface during leaching. *Chemosphere* **49**, 1375-1388.
55. NRC, 1985. *Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects*, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.
56. Browman M.G., Chesters G., 1977. The Solid Water Interface: Transfer of Organic Pollutants Across the Solid Water Interface. In: Suffet I.H. (Ed), *Fate of Pollutants in the Air and Water Environments*. John Wiley & Sons, New York, 49-88.

57. NRC, 2003. *Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications*, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.
58. Kaplan I.R., Galperin Y., Lu S., Lee R., 1997. Forensic Environmental Chemistry: differentiation of fuel-types, their sources and release time. *Organic Geochemistry*, **27**, 289-317.
59. NRC, 1994. *Alternatives For Ground Water Cleanup*, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.
60. Atlas R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews* **45**, 180-209.
61. Atlas R.M., 1995. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* **31**, 178-182.
62. Rieser-Roberts, E., 1998. *Remediation of petroleum contaminated soils*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, US
63. Reineke, W., 2001. Aerobic and Anaerobic Biodegradation Potentials of Microorganisms. In: Beek, B. (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry, Biodegradation and Persistence*. Volume 2K, Springer, 1-161.
64. Atlas R.M., 1995. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* **31**, 178-182.
65. Peters K.E., Moldowan J.M., 1993. *The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments*, Prentice Hall, Englewood Cliffs (NJ).
66. Al Hadhrami M.N., Lappin-Scott H.M., Fisher P.J., 1995. Bacterial survival and *n*-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. *Marine Pollution Bulletin* **30**, 403-408.
67. Oudot J., Merlin F.X., Pinvidic P., 1988. Weathering Rates of Oil Components in Bioremediation Experiment in Estuarine Sediments. *Marine Environmental Research* **45**, 113-125.
68. Neff, J.M. 1990. Composition and fate of petroleum and spill treating agents in the marine environment. In: Geraci J.R. and St. Aubin D.J. (Eds.), *Sea Mammals and Oil: Confronting the Risks*. Academic Press, New York, 1-33.
69. Lewis, A., Aurand, D., 1997. *Putting Dispersants to Work: Overcoming Obstacles*. An Issue Paper prepared for the 1997 Oil Spill Conference, Washington, D.C.
70. Mackay, D. McAuliffe, C.D., 1988. Fate of Hydrocarbons Discharged at Sea. *Oil & Chemical Pollution* **5**, 1-20.
71. McLean, J.D., Spiecker, P.M., Sullivan, A. P., Kilpatrick, P.K., 1998. The role of petroleum asphaltenes in the stabilization of water-in-oil emulsions. In: Mullins, O.C., Sheu, E.Y. (Eds.), *Structure and dynamics of asphaltenes*. Plenum Press, New York, 377-422.

72. Fingas, M.F., Fieldhouse, B., Lane, J., Mullin, J.V., 2000. Studies of water-in-oil emulsions: Long-term stability, oil properties and emulsions formed at sea. In: *Proceedings of the twenty-third arctic and marine oil spill program technical seminar*, Environment Canada, Ottawa, 145-160.
73. Lacaze, J.C., Villedon De Naide, O., 1976. Influence of illumination on phytotoxicity of crude oil. *Marine Pollution Bulletin* **7**, 73-77.
74. Robles-Gonzales I.V., Fava, F., Poggi-Varaldo, H.M., 2008. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microbial Cell Factories*, **7**, 5
75. Philp J.C., Atlas, R.M., 2005. *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup*, ASM Press, Washington, D.C., 139–236.
76. Alvarez, P.J.J., Illman, W.A., 2006. *Bioremediation and Natural Attenuation: Process Fundamentals and Mathematical Models*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken
77. Prince, R.C., 2000. *Bioremediation*, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Willey & Sons
78. Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74**, 63–67.
79. Thompson, I.P., Van Der Gast, C.J., Ciric, L., Singer, A.C., 2005. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology* **7**, 909–915.
80. Fantroussi, S.I., Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. *Current Opinion in Microbiology* **8**, 268–275.
81. Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I., Okuyama, H., 2007. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**, 1739–1745.
82. Vidali M., 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* **73(7)**, 1163–1172.
83. NRC, 1993. *In Situ Bioremediation. When Does It work?* National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.
84. Saadoun I., 2008. *Bioremediation Laboratory manual*, Islamic University of Gaza, Department of Biotechnology
85. Atlas, R.M., Bartha, R., 1993. *Microbial Ecology Fundamentals and Applications*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC., Reedwood City, CA. 53-56, 533-545.
86. Bossert, I.D., Bartha, R., 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York, 435-474.

87. O'Brien, P.Y., Dixon, P.S., 1976. The effects of oil and oil components on algae; a review. *British Phycological Journal* **11**, 115-142.
88. Brito, E.M.S., Guyoneaud, R, Goñi-Urriza M, Ranchou-Peyruse A, Verbaere, A, Crapez, M.A.C, Wasserman, J.C.A., Duran, R., 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology* **157(8)**, 752-62.
89. Chaillana F, Flècheb A, Burya E, Phantavonga Y-hui, Saliot A, Oudot J., 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* **155(7)**, 587-595.
90. Fritsche W., Hofrichter, M., 2000. Aerobic degradation by microorganisms. In: Klein, J. (Ed.), *Environmental Processes-Soil Decontamination*, Wiley-VCH, Weinheim, 146-155.
91. Khomenkov, V.G., Shevelev, A.B., Zhukov, V.G., Zagustina, N.A., Bezborodov, A.M., Popov, V.O., 2008. Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic biodegradation in microorganisms: a review. *Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiya* **44** (2008) 133–152.
92. Milicic-Terzic, J., Lopez-Vidal, Y., Vrvic, M.M., Saval, S., 2001. Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a Diesel-contaminated soil, *Bioresource Technology* **78**, 47–54.
93. Milicic-Terzic, J., Lopez-Vidal, Y., Vrvic, M.M., Saval, S., 2000. Biodegradation potential assessment of microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil. *Water Science and Technology* **42**, 403–406.
94. Terzić, J., 1998. *Proučavanje biodegradacionog potencijala zemljišta za ugljovodonike nafte detekcijom kataboličkih gena*, Magistarska teza, Hemijski fakultet, Beograd
95. Van Hamme J.D., 2004. Biodegradation and Bioremediation, Singh, A., Ward, O.P., (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 37–56.
96. Brusseau, M.L., Miller, R.M., Zhang, Y., Wang, X., Bai, G.Y., 1995. Biosurfactant and cosolvent enhanced remediation of contaminated media. *ACS Symposium Series* **594**, 82–94.
97. Bai, G., Brusseau, M.L., Miller, R.M, 1997. Biosurfactant enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *Journal of Contaminant Hydrology* **25 (1-2)**, 157–170.
98. Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E.Z., Rosenberg, R., 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Applied and Environmental Microbiology* **65(6)**, 2697–2702.
99. Cerniglia, C. E., 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **9 (5-6)**, 324-33.
100. Bartha, R., 1986. Biotechnology of Petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecology* **12**, 155-172.

101. Watkinson, R. J., Morgan, P., 1990. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation* **1**, 79–92.
102. Wang Z., Fingas M., 1997. Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **774**, 51-78.
103. Peters K.E., Moldowan J.M. 1993. The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossils. In: *Petroleum and Ancient Sediments*, Prentice Hall, Englewood Cliffs (NJ).
104. Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**, 351–368.
105. Beškoski, V., 2011. *Proučavanje aktivnosti konzorcijuma zimogenih mikroorganizama zemljišta zagađenog naftom i njenim derivatima i njihova primena za bioremedijaciju*, Hemijski fakultet, Beograd
106. Atlas, R.M., 1995. *Handbook of media for environmental microbiology*, CRC Press
107. Stainer, R.Y., 1986. *The Microbial World*, 5th ed., Prentice-Hall, NJ
108. Kostić, A., 2007. *Inženjering zaštite životne sredine, Osnovi inženjeringa uklanjanja postojećeg zagađenja*, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd
109. Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74**, 63–67.
110. Aleksander, M, 1999. *Biodegradation and Bioremediation*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, CA
111. Ilić, M., 2011. *Transformacije zagađivača naftnog tipa u procesu simulacije biodegradacije u laboratorijskim aerobnim uslovima*, Hemijski fakultet, Beograd

BIOGRAFIJA AUTORA

Milan Novaković je rođen 9. januara 1977. godine u Beogradu. Osnovnu školu, kao i gimnaziju „Sveti Sava“ je završio u Beogradu. Školske 1995/1996. upisao je Hemijski fakultet u Beogradu, a diplomirao je 9. jula 2003. godine, sa srednjom ocenom 7,77 tokom studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Specijalističke studije na Hemijskom fakultetu u Beogradu, na Katedri za primenjenu hemiju kod mentora prof. dr Branimira Jovančičevića, upisao je školske 2004/05 i završio ih sa prosečnom ocenom 10,00. Master studije je upisao školske 2006/2007 godine, a 11. jula 2007. je odbranio master rad (priznat specijalistički rad) pod nazivom. „Ispitivanje uloge hranljive podloge na mikrobiološku razgradnju nafte parafinskog tipa“. Doktorske akademske studije iz hemije životne sredine je upisao školske 2007/2008 godine. Od 2004. do 2011. godine bio je zaposlen u Zavodu za intelektualnu svojinu Republike Srbije kao patentni ispitivač, a od oktobra 2011. je zaposlen kao patentni zastupnik u farmaceutskoj kompaniji Medochemie iz Limasola, Kipar. U okviru svog naučno-istraživačkog rada bavi se biodegradacijom naftnog zagađivača, a posebno je doprineo implementaciji nove analitičke metode na Katedri za primenjenu hemiju, novog propisa za frakcionisanje bitumenske frakcije (izolovanje frakcija masnih kiselina).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милан Новаковић

број индекса 8/2007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај биоремедијационих услова на биодеградацију засићених и ароматичних угљоводоника у загађивачима нафтног типа

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

Потпис докторанда

У Београду, 16. 10. 2013.

Милан Новаковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милан Новаковић

Број индекса 8/2007

Студијски програм Хемија животне средине

Наслов рада Утицај биоремедијационих услова на биодеградацију засићених и ароматичних угљоводоника у загађивачима нафтног типа

Ментор проф. др Бранимир Јованчићевић

Потписани Милан Новаковић

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.

Потпис докторанда

У Београду, 16. 10. 2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај биоремедијационих услова на биодеградацију засићених и ароматичних угљоводоника у загађивачима нафтног типа

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/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 16. 10. 2013.



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