

Bioremedijacija zemljišta kontaminiranog naftom i naftnim derivatima: mikroorganizmi, putanje razgradnje, tehnologije

Vladimir P. Beškoski¹, Gordana Đ. Gojgić-Cvijović¹, Jelena S. Milić¹, Mila V. Ilić², Srđan B. Miletić², Branimir S. Jovančićević^{1,3}, Miroslav M. Vrvic¹⁻³

¹Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za hemiju, Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za remedijaciju, Beograd, Srbija

³Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd, Srbija

Izvod

Bioremedijacija je ekonomski isplativa, zelena tehnologija kojom se zagađujuće supstance biološkim putem transformišu u netoksična jedinjenja ili se potpuno razgrađuju do ugljen-dioksida i vode. Kao biološki agensi se najčešće koriste mikroorganizmi. Da bi se povećala brzina biološke razgradnje bioremedijacijom se optimizuju uslovi za rast mikroorganizama prisutnih u zemljištu aeracijom, dodavanjem hranljivih supstanci, najčešće soli azota i fosfora, a ako je potrebno i dodavanjem posebno pripremljenih kultura mikroorganizama. U ovom radu je dat i pregled naših *ex situ* bioremedijacionih postupaka na industrijskom nivou korišćenih za tretman zemljišta kontaminiranog naftnim ugljovodonicima kao što je zemljište iz rafinerije i zemljišta kontaminirana mazutom ili transformatorskim uljem.

Ključne reči: bioremedijacija, naftni ugljovodonici, mikroorganizmi, zagađenje.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Do zagađenja zemljišta naftnim derivatima dolazi usled eksploatacije, prerade, transporta, skladištenja, korišćenja nafte, a ne malim delom i pri akcidentnim izlivanjima. Godišnje se proizvede 3,91 milijardi tona sirove nafte (2010. godina) [1], a procene su da od toga 0,1% dospeva u životnu sredinu [2] kao rezultat antropogenih aktivnosti. Zagađenje naftom i naftnim derivatima predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje i životnu sredinu [3].

Tehnologije za uklanjanje naftnih zagađujućih supstanci iz zemljišta i njegovo „izlečenje“ (remedijaciju) mogu biti abiotičke (fizičke, hemijske i termičke) i biotičke (bioremedijacija u širem smislu). Mogu se primeniti: a) na samom mestu zagađenja (*in situ*) ili b) izvan mesta zagađenja (*ex situ*). Kod *ex situ* postupaka zemljište treba prethodno iskopati i prebaciti ga do mesta obrade [4,5]. Predmet ovog rada je bioremedijacija, dok se detaljan prikaz abiotičkih tehnologija može naći u prethodnim radovima [4–7].

U svetu se biološke metode koriste dugi niz godina, pa tako u tretmanu zagađenja ugljovodonicima nafte bioremedijaciji pripada oko 25% od svih remedijacionih postupaka [8–11]. U odnosu na abiotičke, biološki postupci imaju komparativnu prednost pošto su ekonomski isplativi i pripadaju „prijateljskim za okolinu“ tehnologijama. Pri ovim procesima dolazi do transformacije u jedinjenja sa smanjenom toksičnošću ili potpune raz-

PREGLEDNI RAD

UDK 502/504:665.6/7:504.5

Hem. Ind. 66 (2) 275–289 (2012)

doi: 10.2298/HEMIND110824084B

gradnje kontaminanta. Na taj način se ne stvara otpad, a tretirano zemljište može da povрати svoju prirodnu biološku aktivnost. Metode se mogu koristiti ne samo za uklanjanje ugljovodonika nafte već i drugih organskih zagađivača (pesticidi, policiklični aromatični ugljovodonici – PAH-ovi, deterđenti, organski rastvarači ili fenoli). Kao biološki agensi se najčešće koriste mikroorganizmi, ali i biljke (fitoremedijacija). U širem smislu bioremedijacija podrazumeva korišćenje bioloških agenasa za uklanjanje većine toksičnih komponenti, uključujući i metale.

Osnovni put za uklanjanje naftnih ugljovodonika u prirodi je biodegradacija. Za mikroorganizame zagađujuće supstance predstavljaju supstrat za rast, pa se tako i ugljovodonici nafte razgrađuju do netoksičnih supstanci i na kraju mineralizuju, odnosno prevode do ugljen-dioksida i vode [12,13]. Postupkom bioremedijacije prirodni procesi biodegradacije se ubrzavaju i optimizuju aeracijom, biostimulacijom (dodatak hranljivih supstanci) i bioaugmentacijom (dodatak mikroorganizama).

Brzina biodegradacije naftnog zagađivača u zemljištu zavisi od prirode i količine ugljovodonika, prisutnosti i degradacionih osobina mikroorganizama u zemljištu, kao i karakteristika samog zemljišta.

UGLJOVODONICI NAFTE KAO SUPSTRATI

Nafta je složena smeša različitih ugljovodonika i srodnih komponenti koji se uobičajeno grupišu u četiri frakcije: zasićena frakcija, aromatična frakcija, jedinjenja azota, sumpora i kiseonika (NSO jedinjenja) i asfalteni [14–16]. Frakcija zasićenih ugljovodonika sadrži

Prepiska: G.Đ. Gojgić-Cvijović, Centar za hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu, Njegoševa 12, p. pr. 473, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: ggojgic@chem.bg.ac.rs

Rad primljen: 24. avgust, 2011.

Rad prihvaćen: 19. oktobar, 2011.

najvećim delom alkane normalnog i račvastog niza i cikloalkane (naftene), dok aromatična frakcija uglavnom sadrži mono- i policiklične ugljovodonike koji mogu da imaju i alkil-bočni niz. NSO jedinjenja i asfalteni su polarna jedinjenja. NSO jedinjenja su rastvorna u nafti, a asfalteni koloidno dispergovani. Asfalteni su visokomolekulska aromatična jedinjenja ili smeše jedinjenja sa većim brojem kondenzovanih aromatičnih prstenova i većim brojem heteroatoma i prisutni su u malim količinama u nafti.

Goriva i maziva, koja se dobijaju preradom nafte, iako homogenija po sastavu od sirove nafte, sadrže molekule različitih fizičko-hemijskih karakteristika. Razlike su u molekulskoj masi, tački ključanja, rastvorljivosti u vodi, hidrofobnosti, gustini i viskozitetu [17].

Brzina biološke razgradnje nije ista za sva jedinjenja prisutna u naftnom zagađivaču. Opšte je prihvaćeno da se ova brzina smanjuje u nizu *n*-alkani > račvasti alkani > račvasti alkeni > *n*-alkil aromatična jedinjenja male molekulske mase > aromatična jedinjenja sa jednim prstenom > ciklični alkani > policiklični aromatični ugljovodonici >> asfalteni [18–21]. Mada je *n*-alkanska frakcija najviše degradabilna, i među pojedinim članovima homologog niza postoje određene razlike u biorazgradivosti. Tako, na primer, C₅–C₁₀ ugljovodonici mogu biti toksični za neke mikroorganizme, jer izazivaju oštećenja lipidne membrane, dok su C₂₀–C₄₀ ugljovodonici hidrofobni i u čvrstom agregatnom stanju na običnim temperaturama, što uslovljava i manju biodegradabilnost.

MIKROORGANIZMI

Upotreba mikroorganizama kao biodegradacionih agenasa je u stalnom porastu zbog ogromnog biodiverziteta i neprevaziđenog kataboličkog potencijala. Degradacione sposobnosti su uslovljene kataboličkim genima i enzimima [22–25]. Osim toga, mikroorganizmi poseduju različite mehanizme za adaptaciju na hidrofobne supstrate kao što su: modifikacija ćelijske membrane, proizvodnja površinski aktivnih supstanci ili upotreba efluks pumpi za smanjenje koncentracije toksičnih komponenti [26].

Dominantni rodovi mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike nafte su kod bakterija: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* i *Bacillus*, kod kvasaca: *Rhodotorulla*, *Candida*, *Sporobolomyces* i *Aureobasidium*, a kod plesni: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* i *Phanerochaete* [27–29].

Pojedini mikroorganizmi imaju sposobnost da razgrade samo određeni broj komponenti nafte, ali mešane kulture kao što su mikrobne zajednice prisutne u zemljištu omogućavaju veći stepen degradacije [30–33]. Neke od komponenti se mogu razložiti samo kometa-bolički – zajedničkim dejstvom više mikroorganizama.

Osim mikroorganizama koji primarno razlažu naftu u zemljištu su prisutni i drugi koji koriste za svoju ishranu komponente nastale primarnom razgradnjom. Uklanjanjem degradacionih proizvoda stimuliše se dalja razgradnja nafte.

PUTANJE DEGRADACIJE UGLJOVODONIKA

Mikroorganizmi mogu da koriste različite ugljovodonike kao izvore energije i izvore ugljenika, azota i sumpora. Od ugljovodonika se najčešće koriste C₁–C₄₀ alkani, cikloalkani, benzen, toluen, etilbenzen, ksilen (Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene – BTEX), PAH-ovi sa dva do šest prstenova, heterociklična jedinjenja kao što su karbazol ili dibenzotiofen (DBT). Biodegradacija ugljovodonika se odvija i pod aerobnim i anaerobnim uslovima. Anaerobna degradacija se odvija znatno sporije od aerobne, ali je značajna u uslovima snižene koncentracije kiseonika i veoma često omogućava razgradnju polihlorovanih bifenila (PCB) [12,19,34].

Aerobna razgradnja

Najbrže i najkompletnije razlaganje većine organskih zagađivača se odvija pod aerobnim uslovima. Početna biohemijska reakcija je ugrađivanje molekulskog kiseonika mono- i dioksidgenazama, a zatim prevođenje nastalih proizvoda u intermedijere centralnih metaboličkih putanja.

Degradacija alkana

Najzastupljeniji način degradacije alkana je terminalna oksidacija ugljovodoničnog niza do primarnog alkohola, koji se dalje oksiduje dehidrogenazama do masne kiseline koja ulazi u proces β-oksidacije. Postoje i druge putanje. Pomoću dioksidgenaza se oksiduju *n*-C₁₀–C₃₀ alkani i C₁₂–C₂₀ alkeni i nastaje aldehid, bez alkoholnog intermedijera. Takođe, pomoću *cis*-desaturaza se uvodi dvostruka veza u alkan. Kod nekih bakterija i kvasaca oksiduju se oba terminusa alkana, što je označeno kao ω-oksidacija i nastaju α,ω-dikarbonske kiseline [35].

Kod bakterija je najbolje proučena putanja razgradnje alkana pomoću enzima koji se nalaze na OCT plazmidu *Pseudomonas putida* GPo1 [34,36]. Prevođenje alkana u alkohol se odvija uz pomoć kompleksa alkan-hidroksilaze, koga čine monooksigenaza integrisana u plazma membranu (AlkB), rubredoksin i rubredoksin-reduktaza. Alkan-hidroksilaze slične AlkB su široko zastupljene i kod gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Okarakterisano je 250 AlkB homologa u najmanje 45 bakterijske vrste [37].

Osim enzima sličnih AlkB postoje i druge alkan-hidroksilaze sa drugim kofaktorima i drugačijom regulacijom [36]. Ovi enzimi se mogu klasifikovati i prema dužini ugljovodoničnog niza koji koriste kao supstrat: metan-monooksigenaze koriste C₁–C₈, membranske AlkB C₅–C₁₆ alkane, ciklične alkane, alkil-aromate, P450 oksi-

genaze eukariota (mikrozomalne, CYP52) i prokariota (CYP153) C₅–C₁₆, flavin-dioksigenaza C₁₀–C₃₀ ugljovodoničke. Kod bakterijskih P450 enzimskih sistema neophodni su feredoksin i feredoksin-reduktaza koja prenosi elektrone sa NADPH do citohroma.

Pojedini mikroorganizmi imaju i više od jednog sistema za degradaciju alkana. Tako, na primer, izolati *Rhodococcus erythropolis* mogu da sadrže i do pet enzima AlkB tipa i tri CYP153 tipa [37].

Degradacija aromatičnih jedinjenja

Sistem za biodegradaciju kod mikroorganizama organizovan je tako da se polazna jedinjenja u većem broju perifernih putanja transformišu do određenih centralnih međuproizvoda kao što su katehol, homogentizat ili protokatehuat koji se prevode do intermedijera ciklusa trikarbonskih kiselina (CTK) [22,38–40].

Katehol je jedan od glavnih intermedijera u katabolizmu aromatičnih jedinjenja (slika 1). Kod većine prokariota ugrađivanjem molekulskog kiseonika pomoću dioksigenaza nastaje najpre *cis*-dihidrodiol, a zatim katehol. Potom se prsten otvara u orto- ili meta-položaju i nastaju *cis,cis*-mukonska kiselina ili njen semialdehid. Alternativno, neki eukarioti kao što su neligninolitike gljive i neki prokarioti koriste citohrom P450-monooksigenazu. Gradi se aren-oksidi, koji se prevode u *trans*-dihidrodiol pre građenja katehola. Neligninolitike gljive proizvode čitav niz oksidovanih metabolita

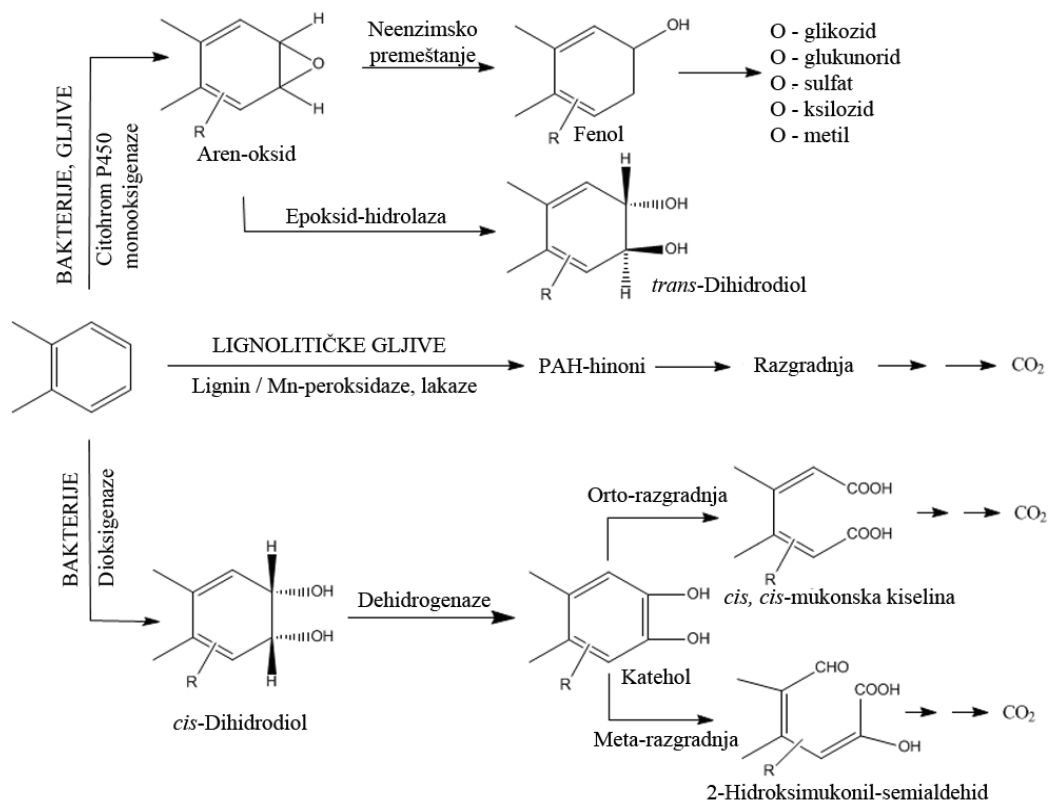
koji su manje toksični nego polazne komponente. Prokarioti dalje oksiduju dobijene proizvode u centralnim metaboličkim putanjama preko uobičajenih intermedijera acetaldehida, piruvata, ćilibarne kiseline, acetil-CoA. PAH-ovi koji imaju do pet prstenova takođe se mogu razgraditi, ali se zbog male rastvorljivosti većinom razgradnja odvija kometabolički.

Ligninolitike gljive proizvode ekstracelularne peroksidaze kao što su mangan- ili lignin-peroksidaze, kao i lakaze koje oksiduju PAH-ove nespecifičnom radikalnom reakcijom. Ovi mikroorganizmi su od posebne važnosti za degradaciju slabo rastvornih supstrata koji se ne mogu transportovati kroz membranu. Ligninolitike gljive mogu da mineralizuju PAH-ove pomoću citohrom P450-monooksigenaze i epoksid-hidrolaza.

NSO jedinjenja i asfaltini su teže degradabilni od zasićene i aromatične frakcije i njihov metabolizam je manje proučen. Razgradnja se uglavnom odvija kometabolički, a važnu ulogu ima i prisustvo *n*-alkana u zagađivaču naftnog tipa. Degradacioni proizvodi alkana kao što su masne kiseline omogućavaju rastvaranje i emulzifikaciju asfaltina [29].

Anaerobna razgradnja

Poslednjih godina se intenzivno proučava anaerobna razgradnja ugljovodoničkih. Mešanim kulturama mikroorganizama moguće je razgraditi: toluen, benzen,



Slika 1. Glavne putanje za aerobnu razgradnju PAH-ova kod bakterija i gljiva [41].

Figure 1. The main pathways for aerobic PAH degradation by bacteria and fungi [41].

naftalen, fenantren, *n*-alkane sa više od šest C atoma i računaste alkane [22,40].

Anaerobna oksidacija se odvija uz redukciju gvožđe (III)-jona, sulfata, oksida mangana ili fumarata, zatim denitrifikaciju, enzimima anoksigenih fotosintetskih bakterija ili sintrofnim konzorcijumom vodoničnih i metanogenih bakterija. Pored bakterijskih postoje i fungalni sistemi kao što je kod kulture *Cladosporium* sp., koja razlaže alifatična jedinjenja u benzinskim rezervoarima.

Kod anaerobne razgradnje prvi deo u nizu hemijskih izmena je uvođenje vode ili fumarata umesto kiseonika. Centralni intermedijer u razgradnji aromatičnih jedinjenja je benzoil-CoA, čija degradacija ide postepenim zasićenjem aromatičnog prstena do pimelil-CoA, koji se kompletno razgrađuje do acetil-CoA i molekula ugljen-dioksida.

FAKTORI KOJI UTIČU NA EFIKASNOST BIOREMEDIJACIJE

Za uspešnost bioremedijacionog procesa pored mikroorganizma sposobnog da razgradi kontaminant kao izvor ugljenika moraju se uzeti u obzir i drugi faktori kao što su lakousvojivi izvor azota i fosfora (hranljive supstance), vlažnost, temperatura, kiseonik (aeracija) i eventualno prisustvo surfaktanata. Osim toga, važne su i karakteristike zemljišta kao što je pH, mineraloški sastav i sadržaj organske supstance [11].

Hranljive supstance

Zagađujuća supstanca predstavlja izvor ugljenika za mikroorganizme, pa je kontaminirano zemljište uglavnom siromašno u azotu i fosforu. Dodatak ovih sastojaka dovodi do povećanog rasta mikroorganizama i ubrjava proces degradacije kontaminanta. Uobičajeno je da se hranljive supstance dodaju u zemljište radi uspostavljanja masenog odnosa ugljenik:azot:fosfor (C:N:P) oko 120:10:1 što je približno odnosu ovih elemenata u biomasi [4,11,12]. Dodatak hranljivih supstanci se označava kao biostimulacija, a može se koristiti mineralno đubrivo ili đubrivo organskog porekla (stajsko đubrivo, aktivni mulj) [13].

Vlažnost

Optimalna vlažnost zemljišta za proces bioremedijacije je 12–30%, ili 40–80% saturacionog kapaciteta. Nedovoljna vlažnost ograničava i smanjuje rast mikroorganizama, dok prevelika vlažnost smanjuje aeraciju zemljišta [42].

Temperatura

Temperatura utiče na mikrobni rast, sastav mikrobnih zajednica i brzinu degradacije zagađivača. Osim toga, od temperature zavisi i viskozitet, rastvorljivost, fizička priroda i hemijski sastav naftnog zagađivača [12,13]. Biodegradacija ugljovodonika se može odvijati

u širokom opsegu temperatura. Izolovani su psihrofilni [43] mezofilni i termofilni [44] mikroorganizmi koji koriste ugljovodonike nafte kao jedini izvor elektrona i ugljenika.

Aeracija

Degradacija naftnih zagađivača se najbrže i najkompletnije ostvaruje pod aerobnim uslovima. Dostupnost kiseonika zavisi od intenziteta ukupne mikrobiološke potrošnje i tipa zemljišta. Za povišenje koncentracije kiseonika u kontaminiranoj sredini se koriste brojne metode poput prevrtanja, prinudne aeracije, mehaničkog mešanja, bioventilacije, uvođenja vazduha i dodatkom alternativnih izvora kiseonika poput vodonik-peroksida ili najčešće magnezijum-peroksida [42].

pH

pH zemljišta određuje tip mikroorganizama koji je na raspolaganju za biodegradaciju. Većini bakterija odgovara neutralni pH, a gljivama slabo kisela sredina. Obično je optimalno pH za bioremedijaciju u granicama od 6 do 8. Ako je zemljište kiseliije dodaje se kreč, a ako je suviše alkalno pH se podešava dodavanjem amonijum-sulfata [12,42].

Surfaktanti

Surfaktanti su jedinjenja koja smanjuju površinski napon vode i povećavaju rastvorljivost hidrofobnih supstanci u vodi. Ugljovodonici se vezuju za čestice zemljišta, pa surfaktanti u porama zemljišta pomažu proces desorpcije nepolarnih jedinjenja sa čestica zemljišta, čime se povećava njihova biousvojivost.

Mogu se koristiti surfaktanati hemijskog i biološkog porekla [45,46]. Hemijski surfaktanti koji se upotrebljavaju u bioremedijaciji treba da budu biodegradabilni i da ne inhibiraju rast mikroorganizama.

Neki mikroorganizmi sintetišu biosurfaktante glikolipide kao što su ramnolipidi kod sojeva *Pseudomonas aeruginosa* ili trehalolipidi kod roda *Rhodococcus*, lipopeptide kao što je surfaktin kod sojeva *Bacillus subtilis*, polimere kao što je emulzan kod bakterije *Acinetobacter calcoaceticus* [47]. Iako je potvrđeno da se biosurfaktanti grade i u zemljištu, uglavnom se smatra da se *in situ* pri bioremedijaciji ne postiže efektivna koncentracija surfaktanta. Kao alternativa postoji i proces gde se ramnolipidi proizvode u odvojenom postupku, a onda dodaju na postrojenje za bioremedijaciju [48].

Zemljište

Tekstura zemljišta utiče na permeabilnost, sadržaj vlage i ukupnu gustinu zemljišta. Fino sprasena zemljišta su manje permeabilna od zemljišta sa krupnim česticama. Zemljišta sa niskom permeabilnošću su obično slepljena i otežavaju distribuciju i transport vlage, hranljivih supstanci i vazduha. Ovakvom zemljištu se prilikom bioremedijacije mogu dodati agensi kao što je

slama ili piljevina radi postizanja željene teksture. Na brzinu i stepen degradacije utiče i tip kontaminiranog zemljišta, sadržaj gline i organske supstance, kao i udeo pojedinih frakcija peska. Zemljište u kome se nalaze pesak i šljunak u preovlađujućoj količini poseduje dobru drenažnu sposobnost, tj. vrlo kratko zadržava vodu i propustljivo je za vazduh [8,12].

Sudbina i ponašanje ugljovodonika u zemljištu zavise od tipa zemljišta i fizičko-hemijskih osobina kontaminanta. Sa povećanjem vremena kontakta između kontaminanta i zemljišta, opada hemijska i biološka dostupnost zagađujuće supstance, a ovaj proces se često naziva „starenje“. Glavni mehanizmi starenja su sorpcija i difuzija (kolektivno nazvane sekvestracija). Kontaminanti koji su podlegli procesu sekvestracije i starenja nisu dostupni za biodegradaciju u zemljištu čak iako su sveže dodata jedinjenja još uvek biodegradabilna [49].

BIOAUGMENTACIJA

Bioaugmentacija predstavlja dodavanje koncentrovane i specijalizovane populacije mikroorganizama (pojedinačni soj ili mešana kultura-konzorcijum). Ova tehnika se koristi za zemljišta u kojim je broj mikroorganizama manji od 10^5 CFU/g [31] ili ukoliko prisutni mikroorganizmi ne poseduju metaboličke putanje za razgradnju kontaminanta. U literaturi se za dodavanje mikroorganizama navode strategije dodavanja čiste kulture, mešane kulture, dodatak genetski modifikovanih organizama (GMO) ili dodatak specifičnog gena pakovanog u vektor tako da se insertuje konjugacijom u nativnu populaciju [50,51].

Kao što je navedeno, mešane mikrobne kulture imaju prednost zbog šireg degradacionog potencijala, sinergizma i mogućnosti kometabolizma. Genetski inženjering se uglavnom koristi za dobijanje bakterijskih sojeva sa visokom sposobnošću za razgradnju teže degradabilnih aromatičnih jedinjenja, posebno halogenovanih derivata [13,52].

Mikroorganizmi koji se upotrebljavaju za bioaugmentaciju mogu se izolovati sa mesta kontaminacije ili se nabaviti iz komercijalnih izvora. Komercijalni mikrobnii preparati ovog tipa u nekim zemljama nisu prihvaćeni u javnosti. Pored toga, GMO se nigde u svetu ne koriste u takozvanim „fild“ (eng. *field*) eksperimentima [9,51,52].

Iako postoji veliki broj publikovanih radova o pozitivnim efektima bioaugmentacije u nekim slučajevima ova tehnika se pokazala kao neuspešna [53,54]. Istraživanja ukazuju da se ubrzo po aplikaciji broj egzogenih mikroorganizama u ispitivanom zemljištu znatno smanji. Razlozi za to mogu biti mnogobrojni: kompeticija između dodatih i prirodno prisutnih mikroorganizama, antagonizam ili predatorstvo (protozoe, bakteriofagi). Osim toga, zemljište je složen heterogen sistem pa pre-

življavanje i sposobnost degradacije kod dodatih mikroorganizama zavise i od fluktuacija u temperaturi, sadržaju vode, pH ili dostupnosti kontaminanta i hranljivih supstanci.

Zbog efikasnosti (ali i zbog javnog mnjenja), najpraktičnije je upotrebiti mikroorganizme izolovane iz zemljišta koje treba da bude dekontaminirano [32]. Pri izolaciji i selekciji mikrobniih kultura pored degradacionih sposobnosti vodi se računa i o sposobnosti za preživljavanje i otpornosti na eventualno prisutne druge zagađujuće supstance [53,55]. Najčešće se priprema mešana kultura, umnožava se i kao aktivna biomasa aplikuje na kontaminiranu lokaciju. Ovakav postupak se označava kao reinokulacija ili autohtona bioaugmentacija [56].

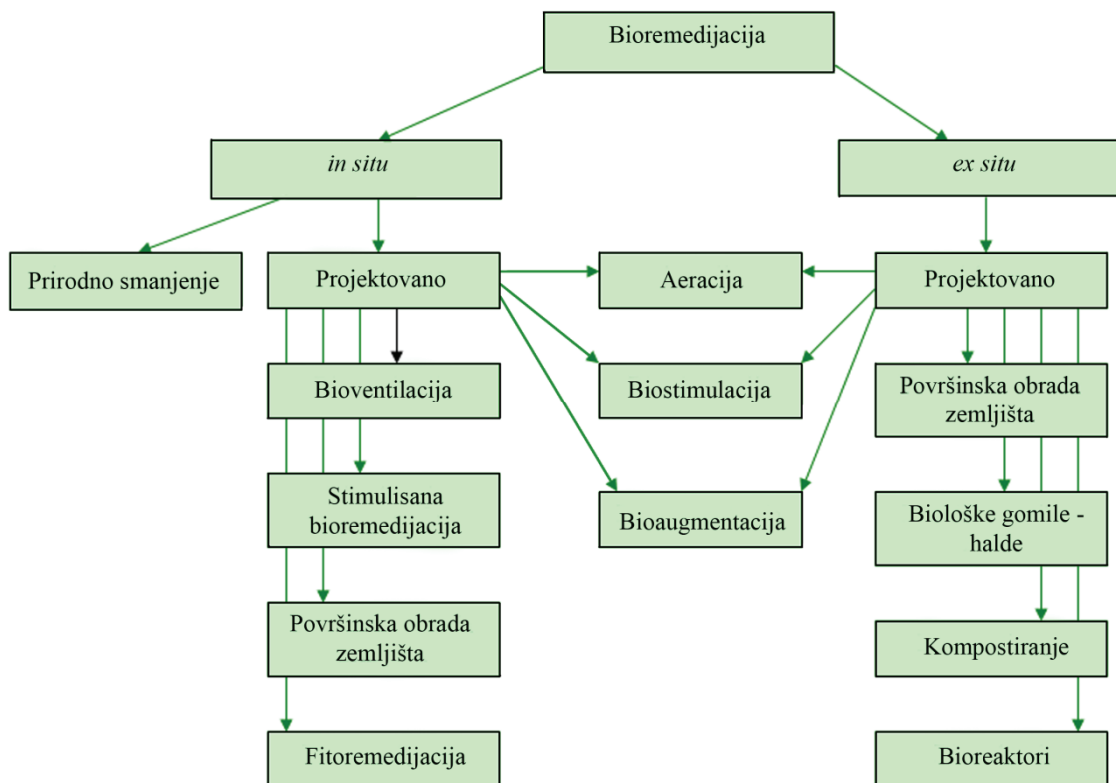
Upotreba nosača (nosećeg materijala) kao fizička potpora za biomasu omogućava bolje preživljavanje. Pored zaštitne uloge idealan nosač treba da bude i netoksičan i za zemljišne mikroorganizme i za inokulante [51]. Inkapsulacija i imobilizacija omogućavaju kontrolu protoka hranljivih supstanci, smanjuju izloženost toksičnim supstancama, smanjuju na minimum oštećenje membrane i štite od predatora i kompeticije, pa tako predstavljaju minijaturni bioreaktor u životnoj sredini. Za inkapsulaciju se upotrebljavaju materijali kao agar, alginat, gelan guma, poliuretana, polivinil-alkohol, karagenan. Za imobilizaciju se koriste lako dostupni prirodni materijali (slama, piljevina, hitin, glina) [9,52].

TEHNOLOGIJE BIOREMEDIJACIJE

Izbor tehnologije za remedijaciju je jedinstven za svaki slučaj i zavisi od niza faktora: vrste i koncentracije kontaminanta, karakteristika zemljišta i terena, graničnih koncentracija koje treba dostići na osnovu zakonske regulative, vremena raspoloživog da se izvede dekontaminacija kao i cene [5,7,8]. Nisu sve tehnologije primenljive za sve slučajeve, a ne mora ni najpovoljnija ekonomska opcija da bude i najbolja tehnička varijanta. Previsoka koncentracija zagađujuće supstance i prisustvo teških metala mogu biti toksični za biološke sisteme, pa prema tome mogu biti i ograničavajući za bioremedijaciju [11]. Osim toga, različite tehnologije, pa i abiotički i biotički postupci, mogu se kombinovati da bi se zagađenje smanjilo do bezbednog nivoa po prihvatljivoj ceni. Na slici 2 prikazan je pregled bioremedijacionih tehnologija.

In situ tehnologije

In situ tehnologije omogućavaju tretman zagađene zemlje na mestu zagađenja, pri čemu se izbegavaju troškovi iskopavanja i transporta [4,5]. Cena postupka je niska, a i najmanje je narušavanje životne sredine. Primena ovog tretmana je ograničena dubinom zemljišta koji se može efikasno obraditi. Uglavnom, kod većine zemljišta efikasna difuzija kiseonika koja će omogućiti



Slika 2. Bioremedijacione tehnologije.
Figure 2. Bioremediation technologies.

odgovarajući stepen bioremedijacije može se postići za dubine od nekoliko centimetara do oko 30 cm. Neke od najvažnijih *in situ* bioloških tehnika su prirodno smanjenje, bioventilacija, stimulisana bioremedijacija, površinska obrada zemljišta i fitoremedijacija.

Prirodno smanjenje (eng. *natural attenuation*), poznato i kao unutrašnja bioremedijacija tj. bioslabljenje (eng. *intrinsic bioremediation or bioattenuation*) pasivni je remedijacioni postupak, koji podrazumeva praćenje prirodnog procesa prečišćavanja koji se odigrava *in situ* bez ikakve stimulacije [7,8]. Kontaminant se podvrgava biodegradaciji, mineralizaciji, isparavanju, razblaženju, disperziji, sorpciji i interakciji sa zemljištem.

Tehnologija je primenljiva za PCB-e, ugljovodonike nafte, eksplozive, pojedine metale i pesticide. Nedostaci su dužina trajanja procesa, potencijalna migracija kontaminanta erozijom, luženjem, isparavanjem i često nemogućnost postizanja željene dekontaminacije. Hidrološki i geohemijski uslovi se mogu promeniti i povećati mobilnost kontaminanta, a time mogu uticati i na remedijacioni proces.

Bioventilacija (eng. *bioventing*) predstavlja injektovanje vazduha u nesaturisanu zonu zagađenog zemljišta takvom brzinom da se ostvari maksimum aerobne mikrobne degradacije organskih jedinjenja a da se isparavanje i oslobađanje kontaminanata u atmosferu smanji na minimum [5].

Tehnika bioventilacije se uspešno primenjuje za naftne derivate kao što su benzin, kerozin, dizel i ulja za grejanje, PAH-ove, ali se može koristiti i za fenole, alkohole i ketone, različite hlorovane rastvarače i BTEX komponente.

Stimulisana bioremedijacija (unapređena, poboljšana, eng. *enhanced bioremediation*) predstavlja primenu biostimulacije (dodatak hranljivih supstanci – azota, fosfora, kiseonika) i/ili bioaugmentacije (dodatak mikroorganizama) na kontaminiranom prostoru u cilju ubrzanja prirodnih biodegradacionih procesa [7,8].

Injektiranje gasova, najčešće vazduha, postiže se pomoću sistema bunara. Aerobni procesi se mogu dodatno stimulisati injektiranjem razblaženog rastvora vodonik-peroksida, a anaerobna biodegradacija rastvorom nitrata. Ova tehnologija je efikasna za remedijaciju zemljišta kontaminiranog ugljovodonicima nafte, pesticidima i nitrotoluenima pogotovo kada je stepen kontaminacije nizak. Ipak, usled povećanja polarnosti može doći i do povećane mobilnosti kontaminanta i njegovog prelaska u podzemne vode, a pod anaerobnim uslovima kontaminant se može transformisati u još toksičnije jedinjenje.

In situ površinska obrada zemljišta se primenjuje za remedijaciju površinskog sloja zemljišta (eng. *landfarming*) (do 50 cm) [5]. Po dodatku hranljivih supstanci i piljevine kontaminirano zemljište se periodično okreće radi aeracije i dodatno kvasi radi čuvanja vlažnosti. Po-

jačana mikrobnost dovodi do degradacije prisutnih ugljovodonika. Metoda se primenjuje *in situ* ukoliko je kontaminacija plitka i ispod nje se nalazi glinoviti sloj ili zaglinjeno vodonepropusno zemljište. Ukoliko je kontaminacija na dubini većoj od 1,5 m zemljište se iskopava i primenjuje se *ex situ* metod. Uspešnost tehnike u velikoj meri zavisi od karakteristika zemljišta (teksture zemljišta, vlage, broja mikroorganizama, pH) i klimatskih uslova (količine padavina, vetra, kao i temperature). Tako na primer, glinovita zemlja nije rastresita i teško ju je aerisati, a često nakon kišnog perioda predugo zadržava vodu usled čega se povećava sadržaj vlage.

Ovo je jednostavna tehnologija, a nedostaci su to što na biološku degradaciju utiču klimatski uslovi, procedne tečnosti moraju se sakupljati i dodatno obrađivati, a teški metali u koncentraciji većoj od 2,5 mg/kg mogu inhibirati mikrobnost.

Fitoremedijacija

Upotreba mikroorganizama u remedijaciji je limitirana kada su u pitanju široko rasprostranjene neorganske zagađujuće supstance, pre svega metali. Remedijacija biljkama ili fitoremedijacija (eng. *phytoremediation*) ima potencijal za akumulaciju, imobilizaciju i transformaciju niskih koncentracija perzistentnih kontaminanata [5]. Proces se zasniva na sposobnosti biljaka da deluju kao solarne pumpe za vodu pri čemu povuku i u vodi rastvorne zagađujuće supstance.

Fitoremedijacija je primenljiva za širok spektar supstanci, brojne metale i radionuklide, različita organska jedinjenja poput hlorovanih organskih jedinjenja, BTEX, PCB-a, PAH-a, pesticida/insekticida, eksploziva i surfaktanata.

Prednosti ove metode su mali projektni troškovi, a ograničenja ove tehnologije su pre svega dugo trajanje remedijacionog procesa, teškoće pri uspostavljanju i održavanju vegetacije na lokacijama sa visokom kontaminacijom, kao i mogućnost povećane mobilnosti proizvoda degradacije i bioakumulacije u životinjama.

Ex situ tehnologije

Površinska obrada zemljišta (eng. *landfarming*) se može realizovati i *ex situ* postupkom [5,8]. Tokom ovog procesa, kontaminirano zemljište se prvo iskopava, potom meša sa otpadom iz drvno-prerađivačke industrije uz dodatak hranljivih supstanci, a zatim se formira sloj ne veći od 0,5 m. Procedne tečnosti se sakupljaju pomoću sistema cevi. Zemljište se poljoprivrednom mehanizacijom periodično okreće čime se povećava aeracija i izbegava heterogena degradacija. Optimalan sadržaj vlage se održava navodnjavanjem ili rasprskavanjem, a optimalno pH dodavanjem gašenog kreča ili fosforne kiseline.

Ova jednostavna tehnika je često korišćena u naftnoj industriji i za naftni mulj. Tehnologija je našla široku

primenu u tretmanu zemljišta kontaminiranog naftnim ugljovodonicima i drugim manje isparljivim biodegradabilnim kontaminantima. Može se upotrebiti i za halogena isparljiva i poluisparljiva jedinjenja, ali i pesticide. Prednosti ove tehnologije su jednostavnost, niska cena i mala procesna kontrola. Nedostaci su to što ova tehnologija zahteva veliki prostor i vreme. Pojedini polutanti se uklanjaju u potpunosti, a drugi ne mogu biti smanjeni ispod granične koncentracije.

Biološke gomile – halde

Uređene biološke gomile (eng. *biopiles*), biološke halde, ili samo halde su projektovani sistemi u kojima se iskopanom zemljištu dodaju hranljive supstance i materijal koji povećava rastresitost [5,7,57–59]. Sistem se aerise radi stimulacije prirodne aerobne mikrobnosti. Proces se odvija na vodonepropusnom terenu što se postiže radom na asfaltu ili postavljanjem čvrstih polietilenskih folija. Za aeraciju se koristi sistem cevi za distribuciju vazduha vakuum-pumpama ili uduvavanjem. Procedne tečnosti se sakupljaju sistemom cevi i prečišćavaju sistemom filtera ili odvede do sabirnog bazena, a odatle se vraćaju prskalicama na haldu.

Zemljište se pokriva nepropusnom folijom radi kontrolisanja gubitka vode isparavanjem, isparavanja štetnih supstanci, kontrolisanja atmosferskih tečnosti, čuvanja toplote, kao i smanjenja rizika od prelaska kontaminanta u nekontaminirano zemljište i vode. Karakteristike zemljišta i klimatski uslovi određuju i utiču na ovaj proces, dok su hranljive supstance, kiseonik, vlaga i pH faktori koji se mogu kontrolisati s ciljem ubrzanja remedijacionog postupka. Optimalna biodegradacija polutanata se ostvaruje obično na temperaturama 20–40 °C.

Biogomile se mogu porediti sa tehnikom „landfarming“ iako se aeracija tom tehnikom postiže mešanjem i prevrtanjem zemljišta i osnovna razlika je u debljini sloja zemljišta koji je podvrgnut bioremedijaciji.

Tehnologija se uspešno primenjuje za obradu halogenih i nehalogenih isparljivih organskih jedinjenja (eng. *volatile organic compounds* – VOCs), naftnih ugljovodonika, poluisparljivih organskih jedinjenja (eng. *semivolatile organic compounds* – SVOCs) i pesticida. Njene prednosti su jednostavnost projektovanja i primene, niska cena, zatim zatvorenost sistema kao i kratko vreme obrade. Potrebna je manja površina zemljišta nego kod tehnike površinske obrade zemljišta. Nedostatak je da prisustvo značajnih koncentracija teških metala inhibira rast mikroorganizama.

Kompostiranje (eng. *composting*) jeste kontrolisan biološki proces kojim se organske supstance komunalnog otpada u zemljištu stabilizuju i transformišu dejstvom mikroorganizama pod aerobnim i anaerobnim uslovima do bezopasnih jedinjenja [60]. Zemljište zagađeno organskim otpadom se iskopava i meša sa strugotinom, piljevinom i drugim otpadom biljnog porekla. Dobijeni materijal se raspoređuje u duge redove i pe-

riodično okreće što omogućava dobro mešanje i aeraciju. Neprijatni mirisi, koji mogu nastati tokom procesa, prečišćavaju se pomoću filtera za tretman vazduha. U zemljištu se održavaju termofilni uslovi (54 do 65 °C). Maksimalna degradaciona efikasnost se postiže održavanjem odgovarajuće količine kiseonika i vlažnosti.

Postoje tri glavna postupka za kompostiranje. U prvom, koji se označava kao aerobne statične gomile, kompost se oblikuje kao gomila, a aeracija se postiže prodivavanjem ili vakuum-pumpama. Kompostiranje se može izvesti i u bioreaktoru uz mehaničko mešanje i aeraciju. Treći sistem je uređeno kompostiranje (eng. *windrow composting*), a kompost se raspoređuje u dugačke uređene gomile u redovima i periodično mehanički meša.

Krajnji proizvod ima veliki mikrobn diverzitet i veću mikrobnu populaciju u odnosu na plodno zemljište, pa se uobičajeno upotrebljava kao dodatak zemljištu, jer sadrži hranljive supstance neophodne biljkama i potpomaže obnavljanje vegetacije narušenog i erodiranog zemljišta.

Proces kompostiranja se primenjuje za zemljišta kontaminirana lako degradabilnim organskim jedinjenjima, komunalnim otpadom, ali i eksplozivima poput 2,4,6-trinitrotoluena (TNT). Prednosti postupka su mogućnost tretmana eksplozivnih sredstava bez spaljivanja, upotreba otpada iz drvne industrije, kao i mogućnost regeneracije siromašnih zemljišta mineralima, mikroorganizmima i organskim supstancama.

Nedostaci tehnike su neophodni prostor, radna snaga, često oslobađanje isparljivih organskih jedinjenja i prašine tokom iskopavanja zemljišta i nemogućnost tretmana zagađenja teškim metalima.

Bioreaktori

Upotreba bioreaktora znatno skraćuje vreme trajanja procesa bioremedijacije. Tehnologija se još naziva i bioremedijacija u tečnom stanju (eng. *slurry phase bioremediation*) [61,62]. Zagađeno zemljište, sediment ili mulj se iskopava, meša sa vodom i ubacuje u bioreaktor. Suspenziji se dodaju hranljive i površinski aktivne supstance uz mešanje mehanički ili aeracijom. Uobičajeno, 10–30% suspenzije u reaktoru je suva supstanca. Zatvoren sistem omogućava kontrolu ne samo temperature, pH ili aeracije već i isparljivih organskih jedinjenja. Po završetku procesa, zemljište se suši, a preostala voda dodatno obrađuje filtriranjem pre ispuštanja u prirodni recipijent u skladu sa lokalnim propisima. Većinom se koriste aerobni sistemi, dok su anaerobni bioreaktori efikasniji za obradu halogenih ugljovodonika dehalogenizacijom.

Ova tehnologija nalazi primenu za remedijaciju zemljišta kontaminiranog ugljovodicima nafte, rastvaračima i pesticidima. Bioreaktori su posebno pogodni za obradu heterogenih zemljišta, zemljišta male permeabilnosti, zemljišta sa područja gde se voda ne zadržava.

Brzina i efikasnost dekontaminacije je znatno veća u odnosu na ostale bioremedijacione procese i može se primeniti čak i za tretman glinovite zemlje. Nedostaci su složenost kontrole procesa, kao i neophodnost dodatnog prečišćavanja preostale vode i visoka sredstva potrebna za sušenje vlažne zemlje. Cena tretmana je najviša u odnosu na druge biološke postupke.

REMEDIJACIONE TEHNOLOGIJE U SVETU I KOD NAS

Tržište zaštite životne sredine i remedijacionih tehnologija je u stalnom porastu. Ispitivanjem tržišta, vrednost globalnog tržišta za remedijaciju opasnog otpada u 2006. godini je iznosila 11,7 milijardi dolara, dok je procena za 2011. godinu 16,6 milijardi dolara, što je porast od 7,8%. Udeo bioloških metoda na ovom tržištu je oko 10% [63].

Po drugim autorima internacionalno tržište za remedijacioni sektor iznosi 30–35 milijardi dolara, a procena za bioremedijaciju pomoću mikroorganizama i fitoremedijaciju je 1,5 milijardi godišnje [64]. Samo u SAD za remedijaciju opasnog otpada se izdvaja oko 12 milijardi, što čini 30% svetskog tržišta. U zapadnoj Evropi ukupno tržište za zaštitu životne sredine iznosi 227 milijardi dolara. Postoji više od 600000 kontaminiranih lokaliteta za čije saniranje se procenjuje da će biti izdvojeno približno 50 milijardi evra tokom niza godina. Za ove potrebe se planira izdvajanje 0,5–1,5% bruto društvenog proizvoda. Velika Britanija, Francuska i Holandija odvajaju najveći deo novca. Za zemlje centralne i istočne Evrope procena za ukupno tržište za zaštitu životne sredine je 15 milijardi dolara sa godišnjim rastom od 6,6%. Rast tržišta za remedijacione tehnologije u ovim zemljama je u korelaciji sa ekonomskim rastom i uvođenjem stroge zakonske regulative u oblast životne sredine.

U Republici Srbiji donošenjem novog Zakona o zaštiti životne sredine 2004. godine i Zakona o upravljanju otpadom 2009. godine stvoreni su preduslovi za razvoj remedijacionih tehnologija. Prema Izveštaju u stanju životne sredine u Republici Srbiji za 2009. godinu i Izveštaju o stanju zemljišta u Republici Srbiji sistematski monitoring zemljišta nije u potpunosti uspostavljen [65,66]. Na osnovu istraživanja Agencije za zaštitu životne sredine identifikovana su 375 kontaminirana lokaliteta na kojima je zagađenje zemljišta potvrđeno laboratorijskim analizama zemljišta i podzemnih voda u neposrednoj blizini lokalizovanih izvora zagađenja i prisutno je u dužem vremenskom periodu. Najveći udeo u identifikovanim lokalitetima imaju komunalne deponije, a najveći deo u okviru industrije ima naftna industrija. Remedijacija je izvršena na 5,7% identifikovanih lokaliteta.

Bioremedijacija je komercijalna tehnologija, koja se u svetu primenjuje već dvadesetak godina na industrijskom nivou, i ima svoje prednosti i ograničenja [10,64].

Prednost bioremedijacije je u tome da najmanje narušava životnu sredinu, naročito kao *in situ* tehnologija, a kao deo zelene hemije i zelenog inženjeringa uklapa se u strategiju održivog razvoja [67,68]. Smatra se bezbednom tehnologijom koja daje krajnje rešenje zagađenja za razliku od skladištenja otpada. Osim toga, cena bioremedijacionih postupaka je u niža u poređenju sa cenom alternativnih tehnologija.

Osnovni nedostaci su da je uobičajeno sporija u odnosu na druge metode i što se ne može upotrebiti za dekontaminaciju zemljišta sa visokom koncentracijom toksičnih supstanci ili neorganskim zagađujućim supstancama. Osim toga, u nekim slučajevima ovom tehnologijom se ne može dostići smanjenje kontaminacije ispod graničnih koncentracija koji zahtevaju lokalni propisi.

U ekonomski razvijenim zemljama kriterijumi u oblasti zaštite životne sredine se podižu kako u pogledu tehnologija remedijacije koji će se koristiti tako i ocene kvaliteta remedijacijom tretiranog zemljišta. U okviru savremenih standarda uvode se ekotoksikološke metode, jer omogućavaju integraciju dejstva svih značajnih supstanci uključujući i one koje nisu obuhvaćene hemijskom analizom. Biološke metode su i u ovom aspektu u prednosti, jer su svojom prirodom usmerene na biodostupni deo bilo kog kontaminanta. Snižavanje koncentracije zagađujućih supstanci koje se postiže biodegradacijom uglavnom se odnosi na biodostupnu frakciju, pa ostaci kontaminanta mogu biti detektovani analitičkim tehnikama, a ne moraju da imaju uticaj na okolinu. Na drugoj strani nebiološke metode mogu da ostave biodostupne kontaminante u niskim koncentracijama.

PRIMERI USPEŠNO IZVEDENIH BIOREMEDIJACIONIH POSTUPAKA

Metodologija rada pri remedijaciji zagađenog mesta je specifična za svaki kontaminant i teren i mora biti

cenu o vremenu i troškovima izvođenja operacije [8,51,69–72]. Sve aktivnosti treba da budu u skladu sa zaštitom životne sredine.

U tabeli 1 prikazani su primeri naših bioremedijacionih postupaka na poluindustrijskom i industrijskom nivou koji su izvedeni u periodu od 2005. godine. Kao ilustracija, bioremedijacija zemljišta kontaminiranog transformatorskim uljem je opisana detaljnije.

Rezultati prikazani u tabeli 1 govore u prilog uspešnoj primeni ove tehnologije na industrijskom nivou. Bioremedijacijom se i veoma visoke koncentracije različitih kontaminanta mogu sniziti do zakonski prihvatljivog nivoa.

Bioremedijacija zemljišta kontaminiranog transformatorskim uljem

Do kontaminacije zemljišta transformatorskim uljem je došlo na lokalitetu trafostanice „Bor 2“ nakon akcidenta, izlivanja ulja iz havarisanog transformatora i naknadnog istakanja iz uljne jame. Zemljište je iskopano, prebačeno na vodonepropusnu površinu i analizirano na sadržaj naftnih ugljovodonika. Analize su pokazale da je sadržaj ukupnih ugljovodonika nafte u zemljištu u granicama 6,1–58,9 g/kg što prevazilazi interventnu (remedijacionu) vrednost po važećim propisima*. pH vrednost uzoraka zemljišta je bila u granicama od 5,8 do 7,1, a sadržaj glinovite frakcije u zemljištu je bio oko 33%. Ukupan sadržaj mikroelemenata i teških metala (Cu, Zn, Pb, Cd, Ni, Cr i As) u uzorcima nije prelazio maksimalno dozvoljene količine za poljoprivredno zemljište. Mikrobiološkim analizama je utvrđeno prisustvo viabilnih mikroorganizama u svim uzorcima što je ukazivalo da zemljište može da bude tretirano biološkim metodama. Ukupan broj bakterija je bio u granicama od $3,2 \times 10^4$ do 2×10^6 CFU/g zemljišta, kvasaca i plesni $1-3 \times 10^2$ CFU/g, a mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike $4 \times 10^3-6 \times 10^4$ CFU/g. Na osnovu niskih kon-

Tabela 1. Bioremedijacija zemljišta kontaminiranog različitim naftnim zagađujućim supstancama
Table 1. Bioremediation of soil polluted by various petroleum products

Poreklo zagađenog zemljišta	TPH ^a , početak-kraj g/kg suvog zemljišta	Količina, m ³	Vreme, meseci	Literatura
Rafinerija Pančevo	29,99–2,17	150	6	33,59,73,74
Koncentrat otpadne emulzije Fabrike maziva Kruševac i vanbilasni mazut	39,9–0,5	600	6	73,75
Vanbilasni mazut, Beogradske elektrane	5,2–0,3	600	3	58,73,76
Transformatorsko ulje Bor, Elektromreža Srbije	19,44–1,55	650	6	77

^aTotal Petroleum Hydrocarbons (ukupni ugljovodonici nafte)

zasnovana na naučnim i tehničkim kriterijumima. Uobičajeno je da se pored osnovne karakterizacije kontaminiranog zemljišta uvek rade probe razgradnje na laboratorijskom i „pilot“ nivou da bi se dobili podaci o efikasnosti tehnologije. Osim toga, pri povećanju razmera na industrijski nivo važno je i napraviti približnu pro-

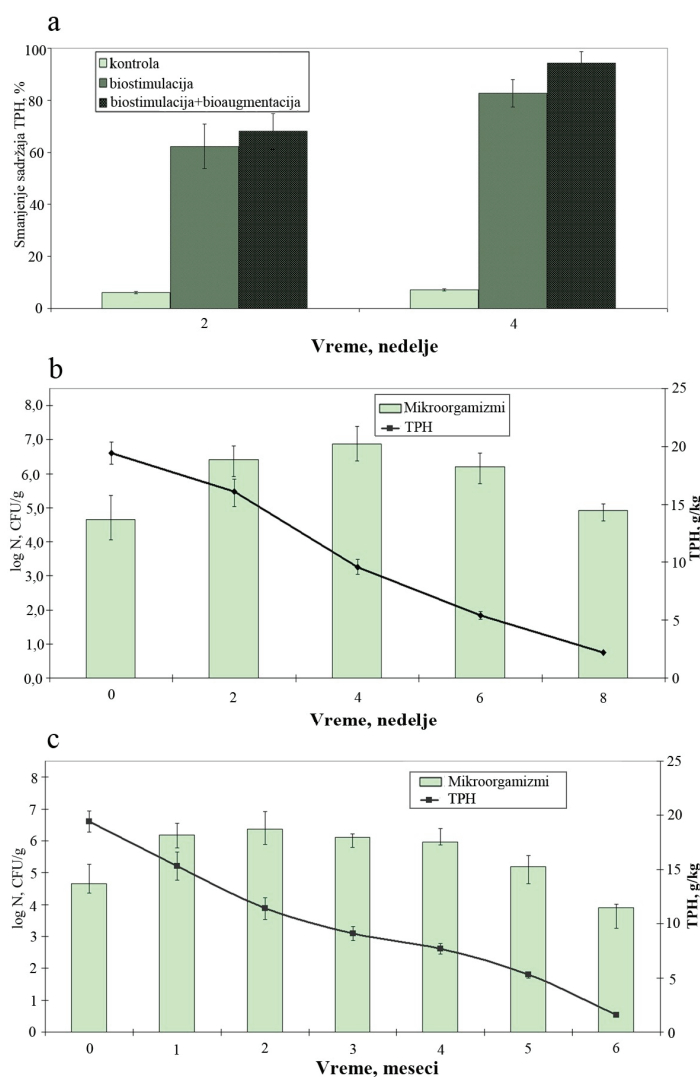
* Po Uredbi o programu sistemskog praćenja kvaliteta zemljišta, indikatorima za ocenu rizika od degradacije zemljišta i metodologiji za izradu remedijacionih programa (Sl. glasnik RS, br. 88/2010) granična vrednost za zagađeno zemljište za mineralna ulja (ukupne ugljovodonike nafte) iznosi 50 mg/kg, a remedijaciona vrednost iznosi 5000 mg/kg zemljišta.

centracija azota (0,05–0,16%) i dostupnog fosfora (25–45 mg/kg) u zemljištu pretpostavlja se da bi dodatak mineralnih sastojaka (biostimulacija) delovao povoljno na povećanje broja mikroorganizama i brzinu razgradnje ugljovodonika pri procesu.

U okviru preliminarnih analiza uobičajeno je da se u laboratorijskim uslovima ispita biodegradacioni potencijal, odnosno sposobnost mikroorganizama prisutnih u zemljištu da razgrade ugljovodonike. Testovi su rađeni u erlenmajerima uz aeraciju i mešanje na rotacionoj mućkalici na 200 obrt/min [55,69]. Odnos čvrsti uzorak:rastvor za biostimulaciju (0,1% amonijum-nitrat, 0,025% dikalijumhidrogen-fosfat) bio je 1:5 (m/V). Za bioaugmentaciju upotrebljena je aktivna biomasa mik-

roorganizama koji razlažu ugljovodonike, pripremljena „obogaćivanjem“ (eng. *enrichment*) iz kontaminiranog materijala. Sa slike 3a, na kojoj su prikazani rezultati naših laboratorijskih testova, uočava se da se samo biostimulacijom posle četiri nedelje postiže stepen razgradnje ugljovodonika 85%. Dodatkom biomase mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike postižu se još bolji rezultati i stepen razgradnje iznosi preko 90%. Na osnovu ovih rezultata odlučeno je da u sledećem koraku, pilot” eksperimentu, pored biostimulacije koristi i bioaugmentacija da bi se proces ubrzao i da bi se postigao veći stepen razgradnje.

Pilot eksperiment je izveden na uzorku zemljišta u količini 0,3 m³ koji je pomešan sa istom količinom peska



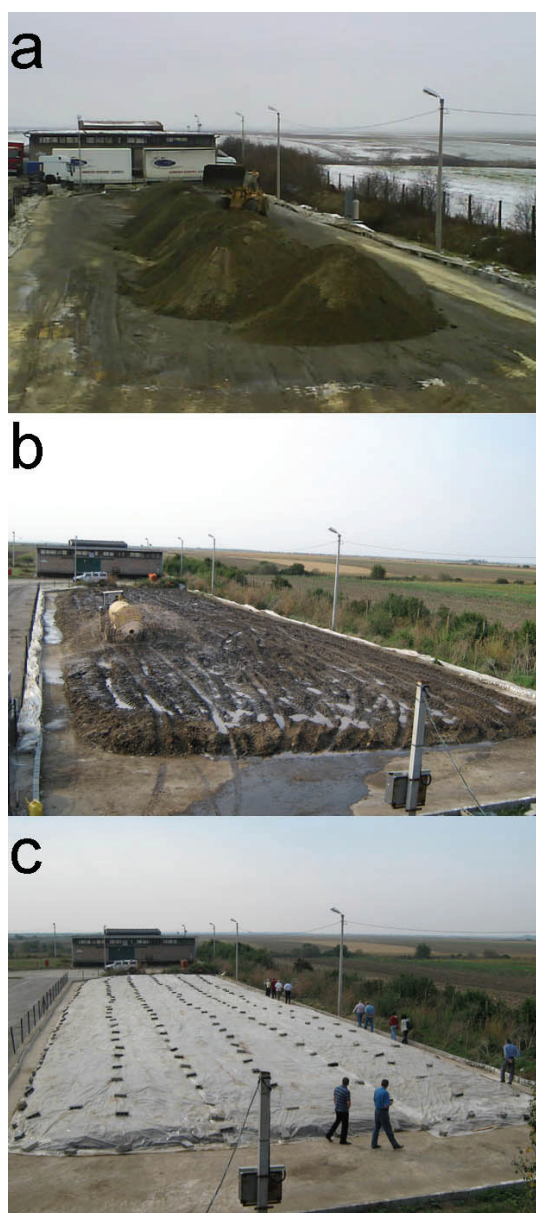
Slika 3. Efikasnost biodegradacije ugljovodonika. a) Efekat biostimulacije i bioaugmentacije na biodegradaciju ugljovodonika na laboratorijskom nivou; b) promene u sadržaju ukupnih ugljovodonika nafte i broja mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike tokom „pilot“ bioremedijacije; c) promene u sadržaju ukupnih ugljovodonika nafte i broja mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike tokom bioremedijacije na industrijskom nivou.

Figure 3. Efficiency of hydrocarbon biodegradation. a) The effect of biostimulation and bioaugmentation on hydrocarbon biodegradation – laboratory study; b) changes in total petroleum hydrocarbon content and number of hydrocarbon degraders during pilot bioremediation; c) changes in total petroleum hydrocarbon content and number of hydrocarbon degraders during bioremediation on industrial level.

i $0,04 \text{ m}^3$ piljevine u plastičnom kontejneru zapremine 1 m^3 . Zemljištu su dodati rastvori kalijum-nitrata, diamonijum-fosfata i kalijum-hlorida za postizanje optimalnog C:N:P:K odnosa (približno 100:10:1:0,1). Uzorci su mešani svake nedelje i aktivna biomasa mikroorganizama je dodavana svake druge nedelje. Promene u broju mikroorganizama koji razgrađuju ugljovodonike i smanjenje sadržaja ugljovodonika u zemljištu tokom ovog eksperimenta prikazane su na slici 3b. Uočava se da je nakon 8 nedelja postignuto smanjenje TPH od 89%. Na osnovu ovih preliminarnih testova predložena je i realizovana *ex situ* bioremedijacija.

Na haldi za *ex situ* bioremedijaciju se nalazilo oko 650 m^3 zemljišta dobijenog mešanjem oko 300 m^3 zauljenog zemljišta kontaminiranog mineralnim transformatorskim uljem sa 300 m^3 rečnog neispranog peska i 40 m^3 piljevine mekog drveta. Pesak je korišćen kao noseći materijal za razblaživanje, a u njemu prisutna organska supstanca kao alternativni izvor ugljenika. Piljevina doprinosi povećanju retencionog vodnog kapaciteta i mogućnosti zemljišta da zadrži vodu, ali predstavlja i dodatni izvor ugljenika za stimulaciju celulolitičkih mikroorganizama.

Materijal je homogenizovan upotrebom utovarivača i raspoređen na asfaltnoj vodonepropusnoj površini ta-



Slika 4. Fotografije halde za *ex situ* bioremedijaciju. a) Mešanje kontaminiranog zemljišta sa piljevinom i peskom; b) rasprskavanje rastvora za biostimulaciju i kvašenje; c) konačni izgled halde.

Figure 4. Photographs of an *ex situ* bioremediation biopile. a) Mixing of polluted soil with sawdust and sand; b) spraying of biostimulation solution and watering; c) final bioremediation biopile.

ko je dobijena halda dimenzija 75 m×20 m×0,4 m. Optimalni C:N:P:K odnos (približno 100:10:1:0,1) dostignut je dodavanjem rastvora amonijum-nitrata, diamonijum-fosfata i kalijum-hlorida (biostimulacija). U rastvor je dodat i komercijalni surfaktant čija je efikasnost proverena u laboratorijskim uslovima [55]. Rastvori su nanošeni sistemom za rasprskavanje tečnosti. Procedne tečnosti su skupljane u rezervoar odakle su rasprskavanjem vraćane na haldu (Slika 4).

Za bioaugmentaciju je upotrebljena biomasa mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike. Mešana kultura mikroorganizama izolovanih iz kontaminiranog materijala je pripremljena „obogaćivanjem“ (*enrichment*) i sukcesivno umnožena od laboratorijskog nivoa do zapremine 1m³ u mobilnom reaktoru na mestu tretmana.

Vlažnost je tokom tretmana održavana u okviru 40–60% retencionog vodnog kapaciteta. Zemljište je prevrtano i mešano svake dve nedelje, a rastvori hranljivih supstanci i aktivna mikrobna biomasa su dodavani u mesečnom intervalu. Da bi se smanjio atmosferski uticaj, ali i isparavanje tokom bioremedijacije, halda je bila prekrivena polietilenskom folijom.

Proces biodegradacije je praćen određivanjem sadržaja ukupnih naftnih ugljovodonika i mikroorganizama koji razlažu ugljovodonike (slika 3c). Nakon šest meseci TPH zemljišta je snižen od početnih 19,44 do 1,55 g/kg suvog zemljišta (92%). Pošto su analize pokazale da je krajnja koncentracija ugljovodonika u zemljištu ispod interventne (remedijacione) vrednosti zemlja je upotrebljena kao pokrivni materijal za komunalnu deponiju.

ZAKLJUČAK

Tržište remedijacionih tehnologija je u stalnom porastu. Iako je učešće bioloških metoda na ovom tržištu oko 10%, bioremedijacija ima značajne prednosti u odnosu na druge tehnologije kako u pogledu cene tako i u efikasnosti u uklanjanju polutanata. Ova tehnologija najmanje narušava životnu sredinu, naročito pri primeni *in situ*, a odgovara i strategiji održivog razvoja. Ipak, bioremedija nije univerzalna i nije primenjiva za svako zagađenje.

Uspešnost bioremedijacije zemljišta zavisi od niza parametara: faktora sredine, dodatka i dostupnosti hranljivih supstanci i tehničkih karakteristika postrojenja. Važno je istaći da se čak i pod optimalnim uslovima pri procesu ne uklanjaju svi kontaminanti, već efektivnost i ekonomska isplativost biološkog procesa zavisi od identifikacije kritičnih faktora i njihove optimizacije.

U Srbiji se tek očekuje razvoj remedijacionih tehnologija, a u svetu gde se bioremedijacija već komercijalno koristi na industrijskom nivou više od deset godina stalno se unapređuju tehnike da bi se proširila lista kontaminanata na koje se tretman može primeniti, a proces ubrzati s ciljem povećavanja efikasnosti. Proučavaju se metaboličke putanje i uloga pojedinih sojeva u mikrobnim zajednicama. Uvode se ekotoksikološke me-

tode za praćenje i evaluaciju toka procesa, proučava se distribucija kontaminanata pre i posle primenjenog tretmana. Od posebne važnosti su strategije za povećanje biodostupnosti kontaminanata kao i uvođenje bioloških koraka u postupke bazirane na hemijskim ili fizičkim metodama.

Zahvalnica

Ovaj rad je rezultat projekata III 43004 i OI 176006 finansiranih od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] BP Statistical Review of World Energy, June 2011 http://www.bp.com/assets/bp_internet/globalbp/globalbp_uk_english/reports_and_publications/statistical_energy_review_2011/STAGING/local_assets/pdf/statistical_review_of_world_energy_full_report_2011.pdf
- [2] O.Ward, A. Singh, J. van Hamme, Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30** (2003) 260–270.
- [3] P.H. Albers, An Annotated Bibliography on Petroleum Pollution. Version 2007. USGS Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, MD. <http://www.pwrc.usgs.gov/infobase/topbibs/petroleum.pdf>
- [4] A. Kostić, Inženjering zaštite životne sredine, Osnovi inženjeringa uklanjanja postojećeg zagađenja, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2007.
- [5] F.I. Khan, T. Husain, R. Hejazi, An overview and analysis of site remediation technologies, *J. Environ. Manage.* **71** (2004) 95–122.
- [6] G. Rasulić, Nafta i životna sredina, zaštita, zagađivanje i remedijacija, Naftna industrija Srbije, Pančevo, 2007.
- [7] E. Reis, A. Lodolo, S. Miertus, Survey of Sediment Remediation Technology, International Center for Science and Technology, UNIDO, Trieste, 2008, <http://www.clu-in.org/download/contaminantfocus/sediments/Survey-of-sediment-remediation-tech.pdf>
- [8] J.C. Philp, R.M. Atlas, in: Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup, R.M. Atlas, J.C. Philp, Eds., ASM Press, Washington DC, 2005, pp. 139–236.
- [9] P.J.J. Alvarez, W.A. Illman, Bioremediation and Natural Attenuation: Process Fundamentals and Mathematical Models, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2006.
- [10] R.C. Prince, Bioremediation, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Willey & Sons, 2000, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471238961.0209151816180914.a01.pub2/pdf>
- [11] R. Boopathy, Factors limiting bioremediation technologies, *Bioresour. Technol.* **74** (2000) 63–67.
- [12] M. Aleksander, Biodegradation and Bioremediation, 2nd ed., Academic Press, San Diego, CA, 1999.
- [13] N. Das, P. Chandran, Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview, *Biotechnol. Res. Int.* (2011), doi:10.4061/2011/941810

- [14] M. Rajković, Nafta i prirodni gas, Prometej, Novi Sad, 2009.
- [15] D. Vitorović, B. Jovančičević, Osnovi organske geohe-mije, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2005.
- [16] M.B. Hocking, Handbook of Chemical Technology, Aca-demic Press, 2005.
- [17] J.G. Speight, Environmental Analysis and Technology for Refining Industry, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2005.
- [18] E.E. Peters, C.C. Walters, J.M. Moldowan, The Biomarker Guide, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 2005.
- [19] O.P. Ward, A. Singh, J.D. VanHamme, G. Voordouw, in: M. Schaechter (Ed.) Encyclopedia of Microbiology. 3rd ed., Elsevier, Oxford, 2009, pp. 443–457.
- [20] B. Jovančičević, M.M. Vrvic, J. Schwarzbauer, H. Wehner, G. Scheeder, D. Vitorović, Organic-geochemical Differentiation of Petroleum-type Pollutants and Study of Their Fate in Danube Alluvial Sediments and Corres-ponding Water (Pančevo Oil Refinery, Serbia), Water Air Soil Pollut. **183** (2007) 225–238.
- [21] T. Šolević, M. Novaković, M. Ilić, M. Antić, M.M.Vrvic, B. Jovančičević, Investigation of the bioremediation po-tential of aerobic zymogenous microorganisms in soil for crude oil biodegradation, J. Serb. Chem. Soc. **76** (2011) 425–438.
- [22] V.G. Khomenkov, A.B. Shevelev, V.G. Zhukov, N.A. Zagustina, A.M. Bezborodov, V.O. Popov, Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic biodegradation in microorganisms: a review, Prikl. Biokhim. Mikrobiol. **44** (2008) 133–152.
- [23] J. Milicic-Terzic, Y. Lopez-Vidal, M.M. Vrvic, S. Saval, Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a Diesel-contaminated soil, Bioresour. Technol. **78** (2001) 47–54.
- [24] J. Milicic-Terzic, Y. Lopez -Vidal, M.M. Vrvic, S. Saval, Biodegradation potential assessment of microbial con-sortia isolated from a diesel-contaminated soil, Water Sci. Technol. **42** (2000) 403–406.
- [25] J. Terzić, Proučavanje biodegradacionog potencijala zemljišta za ugljovodonike nafte detekcijom kataboličkih gena, Magistarska teza, Hemijski fakultet, Beograd, 1998.
- [26] J.D. Van Hamme in: Biodegradation and Bioremediation, A. Singh, O.P. Ward, Eds., Springer-Verlag, Berlin, 2004, pp. 37–56.
- [27] M.T. Balba, N. Al-Awadhi, R. Al-Daher, Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation, J. Microbiol. Methods **32** (1998) 155–164.
- [28] C. Cerniglia, J. B. Sutherland in: Fungi in Bioremediation, G.M. Gadd, Ed., British Mycological Society, Cambridge University Press, Cambridge, 2001, p. 136–187.
- [29] R.C. Kuhad, R. Gupta in: Advances in Applied Biore-mediation, A. Singh, R.C. Kuhad, O.P. Ward, Eds., Springer-Verlag, Berlin, 2009, pp. 173–188.
- [30] K.S.M. Rahman, T.J. Rahman, Y. Kourkoutas, I. Petsas, R. Marchant, I.M. Banat, Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bio-resour. Technol. **90** (2003) 159–168.
- [31] S. Mishra, J. Jyot, R.C. Kuhad, B. Lal, *In situ* bioreme-diation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium, Curr. Microbiol. **43** (2001) 328–335.
- [32] D.M.V. Horakova, M. Nemeč in: Remediation Engi-neering of Contaminated Soils D.L. Wise, D.J. Trantolo, E.J. Eichon, H.I. Inyang, U. Stottmeister, Eds., Marcel Dekker, New York, 2000, pp. 357–372.
- [33] J.S. Milić, V.P. Beškoski, M.V. Ilić, S.A.M. Ali, G.Đ. Gojgić-Cvijović, M.M. Vrvic, Bioremediation of soil heavily con-taminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium, J. Serb. Chem. Soc. **74** (2009) 455–460.
- [34] J.D. Van Hamme, A. Singh, O.P. Ward, Recent advances in petroleum microbiology. Microb. Mol. Biol. Rev. **67** (2003) 503–549.
- [35] M.E. Singer, W.R. Finnerty, in: Petroleum Microbiology R.M. Atlas, Ed., Macmillan Publishing Company, New York, 1984, pp. 1–58.
- [36] J.B. van Beilen, E.G. Funhoff, Alkane hydroxylases in-volved in microbial alkane degradation, Appl. Microbiol. Biotechnol. **74** (2007) 13–21.
- [37] F. Rojo, Degradation of alkanes by bacteria, Environ. Microbiol. **11** (2009) 2477–2490.
- [38] R.H. Peng, Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, FEMS Microbiol. Rev. **32** (2008) 927–955.
- [39] S.M. Bamforth, I. Singleton, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons : current knowledge and future directions, J. Chem. Technol. Biotechnol. **80** (2005) 723–736.
- [40] A.K. Haritash, C.P. Kaushik, Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS): a review, J. Hazard. Mater. **169** (2009) 1–15.
- [41] C.E. Cerniglia, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, Biodegradation **3** (1992) 351–368.
- [42] B. Rittman, P. McCarty, Environmental Biotechnology: Principles and Applications, McGraw-Hill, New York, 2000.
- [43] J. Aislabie, D.J. Saul, J.M. Foght, Bioremediation of hyd-rocarbon-contaminated polar soil, Extremophiles **10** (2006) 171–179.
- [44] C.O. Obuekwe, G. Hourani, S.S. Radwan, High-tempe-rature hydrocarbon degradation activities in Kuwaiti desert soil samples, Folia Microbiol. **46** (2001) 535–539.
- [45] C.N. Mulligan, R.N. Yong, B.F. Gibbs, Surfactant-en-chanced remediation of contaminated soil: a review, Eng. Geol. **60** (2001) 371–380.
- [46] C.N. Mulligan, Environmental applications for biosur-factants, Environ. Pollut. **133** (2005) 183–198.
- [47] A. Singh, J.D. Van Hamme, O.P. Ward, Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects, J. Biotechnol. Adv. **25** (2007) 99–121.
- [48] S.S. Cameotra, P. Singh, Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants, Int. Biodeterior. Biodegrad. **62** (2008) 274–280.
- [49] M. Alexander, Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants, Environ. Sci. Technol. **34** (2000) 4259–4265.

- [50] J.T. Gentry, C. Rensing, I.L. Pepper, New approaches for bioaugmentation as a remediation technology, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **34** (2004) 447–494.
- [51] M. Tyagi, M.M.R. da Fonseca, C.C.C. de Carvalho, Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes, *Biodegradation* **22** (2011) 231–241.
- [52] A. Mroziak, Z. Piotrowska-Seget, Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds, *Microbiol. Res.* **165** (2010) 363–375.
- [53] I.P. Thompson, C.J. van der Gast, L. Ciric, A.C. Singer, Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ. Microbiol.* **7** (2005) 909–915.
- [54] S.I. Fantroussi, S.N. Agathos, Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation, *Curr. Opin. Microbiol.* **8** (2005) 268–275.
- [55] G.D. Gojgic-Cvijovic, J. S. Milic, T.M. Solevic, V.P. Beskoski, M.V. Ilic, L.S. Đokic, T.M. Narancic, M.M. Vrvic, Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study, *Biodegradation* **23** (2012) 1–14.
- [56] A. Ueno, Y. Ito, I. Yumoto, H. Okuyama, Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23** (2007) 1739–1745.
- [57] V. Schulz-Berend in: H.-J. Jördening and J. Winter (Eds.), *Environmental Biotechnology, Concepts and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005, pp. 275–286.
- [58] V.P. Beškoski, G. Gojgic-Cvijovic, J. Milić, M. Ilić, S. Miletić, T. Šolević, M.M. Vrvic, M.M., *Ex situ* bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – A field experiment, *Chemosphere* **83** (2011) 34–40.
- [59] B. Jovančičević, M. Antić, I. Pavlović, M. Vrvic, V. Beškoski, A. Kronimus, J. Schwarzbauer, Transformation of petroleum saturated hydrocarbons during soil bioremediation experiments, *Water Air Soil Poll.* **190** (2008) 299–307.
- [60] United States Environmental Protection Agency, *An Analysis of Composting As an Environmental Remediation Technology*, EPA530-R-98-008, Solid Waste and Emergency Response (5306W), 1998.
- [61] <http://www.epa.gov/osw/conservation/rrr/composting/publications/analpt1.pdf>
- [62] D.A. Mitchell, N. Krieger, O.F. von Meien, L.F. de Lima Luz Junior, J.D. Fontana, L. B.B. Tavares, M.B. Palma, G.L. Sant'Anna Junior, L. dos Reis Castilho, D.M.G. Freire, J. A. Arcas in: L.K. Wang, V. Ivanov, J.-H. Tay, Y.-T. Hung (Eds.), *Environmental Biotechnology*, Humana Press, New York, 2010, pp. 287–342.
- [63] I.V. Robles-Gonzales, F. Fava, H.M. Poggi-Varaldo, A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments, *Microb. Cell Fact.* **7** (2008) 5
- [64] BCC Research, *Environment, Global Markets for Hazardous Remediation Technologies*, April 2006, <http://www.bccresearch.com/report/ENV006A.html>
- [65] A. Singh, R.C. Kuhad, O.P. Ward, in: *Advances in Applied Bioremediation*, A. Singh, R.C. Kuhad, O.P. Ward, Eds., Springer-Verlag, Berlin, 2009, pp. 1–19.
- [66] Agencija za zaštitu životne sredine, *Izveštaj o stanju životne sredine u Republici Srbiji*, Beograd, 2010, <http://www.sepa.gov.rs/download/Izveštaj%20o%20stanju%20zivotne%20sredine%20u%20Republici%20Srbiji%20za%202009%20godinu.pdf>
- [67] Ministarstvo životne sredine i prostornog planiranja, *Izveštaj o stanju zemljišta u Republici Srbiji*, Beograd, 2009, http://www.sepa.gov.rs/download/Stanje_zemljišta.pdf
- [68] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, 1998.
- [69] P.T. Anastas, J.B. Zimmerman, *Environ. Sci. Technol.* **37** (2003) 95A–101A.
- [70] A. Singh, O.P. Ward, R.C. Kuhad, in: *Manual of Soil Analysis, Monitoring and Assessing Soil Bioremediation* R. Margesin, F. Schinner, Eds., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2005, pp. 131–159.
- [71] S. Saval, J.S. Terzić, M. M. Vrvic, *Bioremedijacija zagađenih zemljišta i akvifera*, *Acta biologica iugoslavica - serija B: Mikrobiologija* **43** (2006) 65–76.
- [72] M. Ilić, *Transformacije zagađivača naftnog tipa u procesu simulacije biodegradacije u laboratorijskim aerobnim uslovima*, Doktorska teza, Hemijski fakultet, Beograd, 2011.
- [73] M. Ilić, M. Antić, V. Antić, J. Schwarzbauer, M.M. Vrvic, B. Jovančičević, Investigation of bioremediation potential of zymogenous bacteria and fungi for crude oil degradation, *Environ. Chem. Lett.* **9** (2011) 133–140.
- [74] V. Beškoski, *Proučavanje aktivnosti zimogenih konzorcijuma zemljišta zagađenog naftom i njenim derivatima i njihova primena za bioremedijaciju*, Doktorska teza, Hemijski fakultet, Beograd, 2011.
- [75] B. Jovančičević, M. Antić, M. Vrvic, M. Ilić, M. Novaković, M.R. Saheed, J. Schwarzbauer, Transformation of petroleum pollutant during soil bioremediation experiments, *J. Serb. Chem. Soc.* **73** (2008) 577–583.
- [76] V.P. Beskoski, G. Gojgic-Cvijovic, M. Kukic, M. Radulovic, M. Grubac-Mihailovic, M.M. Vrvic, *Real environmental biotechnology as green chemistry: our experience*, in *Book of Abstracts on CD, 29th International Exhibition Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology IACHEM 2009*, Frankfurt am Main, 2009.
- [77] V.P. Beškoski, M. Takić, J. Milić, M. Ilić, G. Gojgic-Cvijovic, B. Jovančičević, M.M. Vrvic, Change of isoprenoids, steranes and terpanes during *ex situ* bioremediation of mazut on industrial level, *J. Serb. Chem. Soc.* **75** (2010) 1605–1616.
- [78] V.P. Beškoski, G. Gojgic-Cvijovic, M. Ilić, J. Milić, S. Miletić, M. M. Vrvic, *Bioremedijacija u sistemu upravljanja zaštitom životne sredine – naša iskustva i primeri*, Šesta regionalna naučno-stručna konferencija o sistemu upravljanja zaštitom životne sredine u elektroprivredi “Electra VI”, Forum kvaliteta, 2010, Zlatibor, Zbornik radova, str. 228–238.

SUMMARY

BIOREMEDIATION OF SOIL POLLUTED WITH CRUDE OIL AND ITS DERIVATIVES: MICROORGANISMS, DEGRADATION PATHWAYS, TECHNOLOGIES

Vladimir P. Beškoski¹, Gordana Đ. Gojgić-Cvijović¹, Jelena S. Milić¹, Mila V. Ilić², Srđan B. Miletić²,
Branimir S. Jovančičević^{1,3}, Miroslav M. Vrvic¹⁻³

¹University of Belgrade, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Department of Chemistry, Belgrade, Serbia

²University of Belgrade, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Department of Remediation, Belgrade, Serbia

³University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

(Review paper)

The contamination of soil and water with petroleum and its products occurs due to accidental spills during exploitation, transport, processing, storing and use. In order to control the environmental risks caused by petroleum products a variety of techniques based on physical, chemical and biological methods have been used. Biological methods are considered to have a comparative advantage as cost effective and environmentally friendly technologies. Bioremediation, defined as the use of biological systems to destroy and reduce the concentrations of hazardous waste from contaminated sites, is an evolving technology for the removal and degradation of petroleum hydrocarbons as well as industrial solvents, phenols and pesticides. Microorganisms are the main bioremediation agents due to their diverse metabolic capacities. In order to enhance the rate of pollutant degradation the technology optimizes the conditions for the growth of microorganisms present in soil by aeration, nutrient addition and, if necessary, by adding separately prepared microbial cultures. The other factors that influence the efficiency of process are temperature, humidity, presence of surfactants, soil pH, mineral composition, content of organic substance of soil as well as type and concentration of contaminant. This paper presents a review of our *ex situ* bioremediation procedures successfully implemented on the industrial level. This technology was used for treatment of soils contaminated by crude oil and its derivatives originated from refinery as well as soils polluted with oil fuel and transformer oil.

Keywords: Bioremediation • Petroleum hydrocarbons • Microorganisms • Pollution