

**BIOREMEDIJACIONI POTENCIJAL KONTAMINIRANOG  
ZEMLJIŠTA****Jelena Milić<sup>1</sup>, Gordana Gojgić-Cvijović<sup>1</sup>, Mila Ilić<sup>1</sup>, Tatjana Šolević<sup>1</sup>, Vladimir P. Beškoski<sup>1</sup>, Branimir Jovančičević<sup>1,2</sup>, Ana Milović<sup>2</sup>, Miroslav Vrvic<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Centar za hemiju-IHTM, Beograd, Srbija<sup>2</sup>Hemijski fakultet, Beograd, Srbija

Cilj ovog rada je bio da se ispita bioremedijacioni potencijal zemljišta kontaminiranog naftom. Ispitana su dva uzorka u uslovima biostimulacije i bioventilacije zimogenih konzorcijuma mikroorganizama. Sadržaj TPH (total petroleum hydrocarbons) u uzorcima (1S i 2S) bio je: 103,2, odnosno 412,6 g/kg suvog zemljišta. Takođe je ispitan i uticaj jednog komercijalnog surfaktanta na populaciju mikroorganizama i biodegradaciju TPH.

Tokom trajanja testa postignuta je biodegradacija TPH od 86 % za 1S i 82 % za 2S, kao i značajno povećanje broja mikroorganizama, koji razgrađuju ugljovodonike. Rezultati testa sa surfaktantom su pokazali još veće smanjenje TPH.

Na osnovu laboratorijskih testova, biostimulacija i bioventilacija se mogu uspešno primeniti za bioremedijacione postupke u industrijskim uslovima.

**Uvod**

Zagađenje životne sredine naftom i derivatima nafte je posledica ljudskog delovanja, odnosno posledica vađenja, transporta, prerade i korišćenja nafte. U toku ovih postupaka može doći do akcidentne i incidentne kontaminacije, a biološka degradacija i detoksikacija zemljišta, površinskih i podzemnih voda i vazduha pomoću mikroorganizama predstavlja savremeni trend u sanaciji ovakvih zagađenja.

Smeša jedinjenja, koja ulaze u sastav nafte, zajedno sa organometalnim konstituentima, supstrati su mikroorganizama, a ujedno su i produkti mikrobnog metabolizma. Zato, kada se nafta izlije u prirodnu sredinu, vrlo je verovatno da je u tom ekosistemu već prisutna mala populacija mikroorganizama, koja će razgraditi ugljovodonične zagađivače. Normalno, u zemlji 0,1 % mikrobiološke populacije koristi ugljovodonike, ali pod selektivnim pritiskom posle prolivanja nafte, može se dostići i 100 % [1, 2].

Tehnike bioremedijacije omogućavaju rast i povećanje mikrobiološke populacije tako što se stvaraju optimalni uslovi koji će omogućiti detoksifikaciju najveće količine kontaminirajuće hemikalije. Da bi bioremedijacija bio uspešna na industrijskoj skali, potrebno je postupak optimizovati u laboratorijskim uslovima [3].

Zbog visoke koncentracije ugljovodonika, a niske koncentracije drugih nutrijenata esencijalnih za mikrobnog rast, stopa degradacije zagađivača limitirana je

koncentracijom kiseonika (aerobi), azota i fosfora. Rast bakterija koje degraduju naftu značajno se povećava dodatkom fertilizera sa N i P i uvođenjem kiseonika [4].

Dostupnost supstrata za biodegradaciju je takođe jedan od faktora koji limitira stopu bioremedijacije. Dodatkom surfaktanata se povećava rastvorljivost nafte i njenih derivata a samim tim i dostupnost supstrata za mikrobiološku razgradnju.

Cilj ovog rada je bio da se ispita potencijal bioremedijacije zemljišta kontaminiranog naftom, a u tom cilju je trebalo napraviti laboratorijsku probu procesa bioremedijacije, i u uslovima biostimulacije i bioventilacije (eksperimenti u erlenmajerima na tresilici) pratiti promene TPH i broja mikroorganizama razgrađivača nafte i njenih derivata.

## **Eksperimentalni deo**

Ispitan je bioremediacioni potencijal dva uzorka koristeći biostimulaciju i bioventilaciju zimogenih mikrobioloških konzorcijuma.

Prvi uzorak (1S) je bila zemlja u kojoj je bioremedijacija već spontano počela (slika 1). Sadržaj TPH (total petroleum hydrocarbons) ovog uzorka je bio 103.25 g/kg suvog zemljišta (60.50 % zasićeni ugljovodonici, 19.50 % aromatični ugljovodonici, 20.00 % NSO jedinjenja).

Drugi uzorak (2S) je predstavljao zemlju visoko kontaminiranu sirovom naftom (slika 2) čiji je TPH sadržaj iznosio 412.56 g/kg suvog zemljišta (54.17 % zasićeni ugljovodonici, 27.07 % aromatični ugljovodonici, 21.76 % NSO jedinjenja).

Takođe je testiran i uticaj jednog komercijalnog sintetičkog surfaktanta na populaciju mikroorganizama kao i na brzinu razgradnje TPH.

ksperimenti su izvedeni u erlenmajerima na tresilici (čvrsta faza: mineralni medijum = 1:9 m/V) na temperaturi od 26°C u trajanju od 12 nedelja (84 dana), uz intezivno mešanje i aeraciju. Izvor fosfora i azota je dodavan svakih 7 dana.

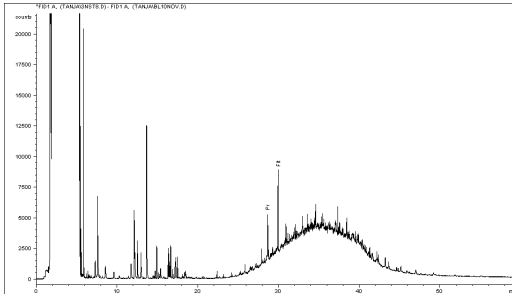
Broj mikroorganizama je određen metodom razblaživanja na agarnim pločama inkubiranim na 26°C. Hranljivi agar je korišćen za određivanje ukupnog broja mikroorganizama, dok je mineralni medijum (1 g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,25 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 % ekstrakt zemljišta, 1 % agar) sa 2000 ppm dizel goriva D-2 [5] korišćen za određivanje broja mikroorganizama razgrađivača ugljovodonika [6]. Gasna hromatografija (metoda ISO 16703:2004) je korišćena za ekstrakciju i kvalitativno određivanje TPH, dok je TPH sadržaj određen gravimetrijski po metodi DIN EN 14345:2004.

## **Rezultati i diskusija**

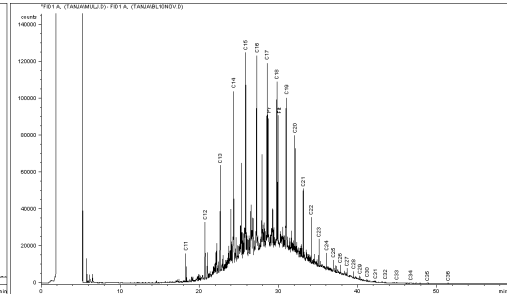
Poređenjem gasnih hromatograma originalnih uzoraka i uzoraka zemlje nakon eksperimenta jasno se može videti smanjenje TPH sadržaja u toku 12 nedelja trajanja eksperimenta.

Na slikama 1, 2, 3 i 4 su prikazani gasni hromatogrami n-heptan ekstrakta uzoraka pre i posle eksperimenta. Na početku hromatograma se detektuju najisparljivije komponente. Najviši intenziteti pikova odnose se na n-alkane (C<sub>10</sub>-C<sub>34</sub>).

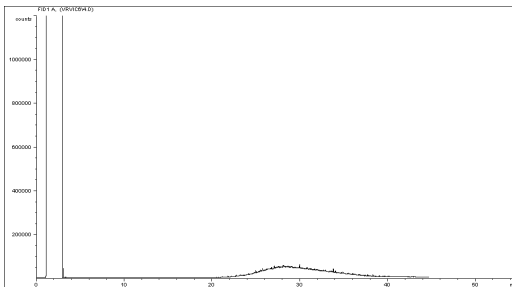
“Brdašce” ili ”hump” koje je prisutno na sva četiri grafika potiče od preklapajućih pikova jedinjenja sa niskom koncentracijom i sličnom isparljivošću (unresolved complex mixture-UCM). Lakše isparljive komponente, i komponente rastvorljivije u vodi se brže biodegradiju, što se vidi i iz asimetričnosti UCM, levi deo ima oštriji pad. Mikrobiološkim delovanjem dolazi do razgradnje polaznih jedinjenja na jedinjenja manje molekulske mase, koja se zatim razgrađuju do CO<sub>2</sub> i vode. UCM počinje od C<sub>11</sub>, ima maksimum na C<sub>17</sub> i opada prema C<sub>23</sub>, što znači da se prvo degraduju n-alkani, a sa produženim trajanjem biodegradacije UCM se pomera ka jedinjenjima veće molekulske mase.



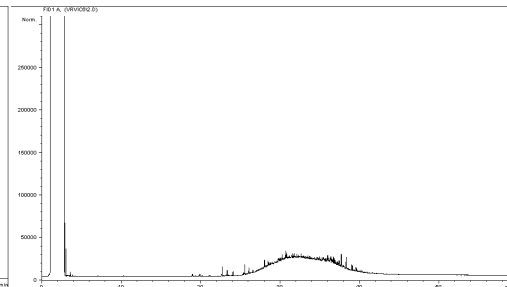
Slika 1. Gasni hromatogram uzorka 1S na početku eksperimenta



Slika 2. Gasni hromatogram uzorka 2S na početku eksperimenta



Slika 3. Gasni hromatogram uzorka 1S na kraju eksperimenta



Slika 4. Gasni hromatogram uzorka 2S na kraju eksperimenta

Početni sadržaj TPH u uzorcima (1S i 2S) bio je: 103,2, odnosno 412,6 g/kg suvog zemljišta.

Tokom trajanja 12 nedelja eksperimenta u uslovima biostimulacije i bioventilacije, koncentracije TPH u uzorcima (1S i 2S) su pale na: 14,31 g/kg (biodegradacija TPH od 86 %), odnosno 72,20 g/kg suvog zemljišta (biodegradacija TPH od 82 %).

Gasno-hromatografski profili pokazuju da su skoro potpuno degradovani alifatični alkani kao i da je “hump” smanjen u odnosu na početak.

Mikrobiološka analiza uzoraka pre i na kraju eksperimenta je pokazala da je broj ukupnih mikroorganizama u toku eksperimenta porastao za, u proseku, četiri reda veličine.

U uzorku 1S udeo razgrađivača dizela u odnosu na ukupni broj mikroorganizama je na početku bio oko 1,6 %, dok je na kraju eksperimenta porastao na 50 %.

U uzorku 2S početni udeo razgrađivača dizela je bio 0,4 %. Do osme nedelje eksperimenta ovaj procenat raste do 26 % ali na kraju eksperimenta pada ispod 0,1 %.

U testu sa uzorkom 2S i jednim komercijalnim surfaktantom udeo mikroorganizama – razgrađivača dizela na kraju 12te nedelje je oko 20 %, što ukazuje na pozitivan uticaj surfaktanta na dostupnost supstrata mikrobima. Tokom 12 nedelja trajanja ovog testa postignuta je biodegradacija TPH od 88 % što je za 6 % više nego u eksperimentu bez surfaktanta.

## **Zaključak**

Na osnovu izvedenih eksperimenata se može zaključiti sledeće:

- U ispitivanim uzorcima zemljišta se nalaze zimogeni konzorcijumi mikroorganizama koji mogu degradovati TPH u uslovima biostimulacije i bioventilacije, stoga se ovi uslovi mogu uspešno primeniti za bioremedijacioni postupak u industrijskim uslovima.

- Surfaktant ima pozitivan uticaj na TPH biodegradaciju, odnosno povećanje broja mikroorganizama – razgrađivača dizela, što je pokazano u testu sa uzorkom 2S sa i bez surfaktanta.

## **Literatura**

- [1] S. Wilkinson, S. Nicklin, J. L. Faull, *Biotransformations: Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection*, Elsevier, 2002, p. 69
- [2] J. D. Van Hamme, Ajay Singh, O. P. Ward, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 4 (2003) 503
- [3] G. Gojgic-Cvijovic, V. P. Beskoski, J. Milic, M. Ilic, T. Solevic, S. Miletic, I. Vuckovic, B. Potkonjak, B. Jovancevic, M. Radulovic, D. Djordjevic, D. Jakovljevic, O. Martinov, S. Spasic, V. Matic, B. Nastasijevic, M. M. Vrvic, *Implementation of remediation in environmental quality improvement, Scientific gathering with international participation, Serbian Chamber of Commerce, Belgrade, 2006*, p. 125
- [4] W. F. M. Röling, M. G. Milner, D. M. Jones, K. Lee, F. Daniel, R. J. P. Swannell, I. M. Head, *Appl. Environ. Microbiol.* 11 (2002) 5537
- [5] C. J. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, Eds., *Manual of Environmental Microbiology*, 2<sup>nd</sup> Ed., ASM Press, Washington, 2002
- [6] J. Milicic-Terzic, Y. Lopez-Vidal, M. M. Vrvic, S. Saval, *Bioresource Technol.* 78 (2001) 48

## Summary

### **BIOREMEDIATION POTENTIAL OF CONTAMINATED SOIL**

#### **Scientific paper**

**Jelena Milić<sup>1</sup>, Gordana Gojgić-Cvijović<sup>1</sup>, Mila Ilić<sup>1</sup>, Tatjana Šolević<sup>1</sup>, Vladimir P. Beškoski<sup>1</sup>, Branimir Jovančičević<sup>1,2</sup>, Ana Milović<sup>2</sup>, Miroslav Vrvic<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Chemistry-ICH<sub>TM</sub>, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

Bioremediation is emerging as a promising technology for the treatment of soil and groundwater contamination. The technology is very effective in dealing with petroleum hydrocarbon contamination. However, bioremediation is a site-specific process and biodegradation by naturally occurring populations of microorganisms could be a major mechanism for the removal of petroleum from the environment. The procedure needs to be optimized in laboratory conditions and that's why laboratory experiments are required before full-scale remediation can be successfully applied.

The aim of this study was to examine the bioremediation potential of soil contaminated with crude oil. Two samples are examined using a biostimulation and bioventilation of zymogenous microbial consortia. TPH (total petroleum hydrocarbons) content in samples (1S and 2S) was: 103.2 and 412.6 g/kg of dry soil, respectively. We have also tested influence of one commercial surfactant on microbial population and TPH biodegradation. Experiments were performed in Erlenmeyer flasks (solid phase:mineral base = 1:9 m/V) on the shaker for 12 weeks. The microbial number is determined by dilution method on agar plates incubated on 26°C. Nutrient agar was used for total microbial number and mineral base medium (1 g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,25 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 % soil extract, 1 % agar) with 2000 ppm diesel fuel for microbes which decompose hydrocarbons. The gas chromatography was used for determination of TPH content.

During the test it has been achieved TPH biodegradation up to 86 % for 1S and 82 % for 2S, and number of hydrocarbon-decomposing microbes was significantly increased. Results from the test with surfactant showed even more TPH reduction. On basis of laboratory tests, biostimulation and bioventilation approaches could be successfully applied on industrial-scale bioremediation treatment.